

RESORPTION UND METABOLISMUS
VON DIALKYLNITROSAMINEN AM RATTENDARM
IN VITRO

URSULA RICHTER-COOBERG

*Diss. München
1965*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof.Dr.W.Forth

vorgelegt über: Prof.Dr.K.Tempel

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. W. Leidl

RESORPTION UND METABOLISMUS VON DIALKYLNITROSAMINEN
AM RATTENDARM IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ursula Richter-Cooberg

aus
Fürth/Bayern

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr. habil. F. Graf

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

1.	Die Organisation	10
2.	Die Aufgabenstellung	11
3.	Die Organisation	12
4.	Die Aufgabenstellung	13
5.	Die Organisation	14
6.	Die Aufgabenstellung	15
7.	Die Organisation	16
8.	Die Aufgabenstellung	17
9.	Die Organisation	18
10.	Die Aufgabenstellung	19
11.	Die Organisation	20
12.	Die Aufgabenstellung	21
13.	Die Organisation	22
14.	Die Aufgabenstellung	23
15.	Die Organisation	24
16.	Die Aufgabenstellung	25
17.	Die Organisation	26
18.	Die Aufgabenstellung	27
19.	Die Organisation	28
20.	Die Aufgabenstellung	29
21.	Die Organisation	30
22.	Die Aufgabenstellung	31
23.	Die Organisation	32
24.	Die Aufgabenstellung	33
25.	Die Organisation	34
26.	Die Aufgabenstellung	35
27.	Die Organisation	36
28.	Die Aufgabenstellung	37
29.	Die Organisation	38
30.	Die Aufgabenstellung	39
31.	Die Organisation	40
32.	Die Aufgabenstellung	41
33.	Die Organisation	42
34.	Die Aufgabenstellung	43
35.	Die Organisation	44
36.	Die Aufgabenstellung	45
37.	Die Organisation	46
38.	Die Aufgabenstellung	47
39.	Die Organisation	48
40.	Die Aufgabenstellung	49
41.	Die Organisation	50
42.	Die Aufgabenstellung	51
43.	Die Organisation	52
44.	Die Aufgabenstellung	53
45.	Die Organisation	54
46.	Die Aufgabenstellung	55
47.	Die Organisation	56
48.	Die Aufgabenstellung	57
49.	Die Organisation	58
50.	Die Aufgabenstellung	59
51.	Die Organisation	60
52.	Die Aufgabenstellung	61
53.	Die Organisation	62
54.	Die Aufgabenstellung	63
55.	Die Organisation	64
56.	Die Aufgabenstellung	65
57.	Die Organisation	66
58.	Die Aufgabenstellung	67
59.	Die Organisation	68
60.	Die Aufgabenstellung	69
61.	Die Organisation	70
62.	Die Aufgabenstellung	71
63.	Die Organisation	72
64.	Die Aufgabenstellung	73
65.	Die Organisation	74
66.	Die Aufgabenstellung	75
67.	Die Organisation	76
68.	Die Aufgabenstellung	77
69.	Die Organisation	78
70.	Die Aufgabenstellung	79
71.	Die Organisation	80
72.	Die Aufgabenstellung	81
73.	Die Organisation	82
74.	Die Aufgabenstellung	83
75.	Die Organisation	84
76.	Die Aufgabenstellung	85
77.	Die Organisation	86
78.	Die Aufgabenstellung	87
79.	Die Organisation	88
80.	Die Aufgabenstellung	89
81.	Die Organisation	90
82.	Die Aufgabenstellung	91
83.	Die Organisation	92
84.	Die Aufgabenstellung	93
85.	Die Organisation	94
86.	Die Aufgabenstellung	95
87.	Die Organisation	96
88.	Die Aufgabenstellung	97
89.	Die Organisation	98
90.	Die Aufgabenstellung	99
91.	Die Organisation	100

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. PROBLEMSTELLUNG	1
II. EINLEITUNG	1
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	7
1. Abkürzungen	7
2. Material	7
2.1. Reagenzien	7
2.2. Geräte	9
3. Versuchstiere	10
4. Versuchsdurchführung	11
4.1. Operation	11
4.2. Perfusion	11
4.3. Blindversuch	14
4.4. Kontrollversuche	15
5. Analytik	15
5.1. Glucosebestimmung	15
5.2. Elektrolytbestimmung	15
5.3. Proteinbestimmung nach modifizierter Lowry-Methode	15
5.4. Radioaktivitätsbestimmung	16
5.5. Untersuchung des Darmes auf Metaboliten	16
5.6. Untersuchung auf kovalente Bindung von Radioaktivität im Darmgewebe	16
5.7. Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC)	17
5.8. Keimzahlbestimmung	19
6. Berechnung der Ergebnisse	19

	Seite
7. Ergebnisse	20
7.1. Vitalitätskriterien	20
7.2. N-Nitrosodiethylamin (NDEA)	20
7.3. N-Nitrosodipropylamin (NDPA)	24
7.3.1. Verteilung der Gesamtradioaktivität	24
7.3.2. Entstehung und Verteilung von Stoffwechselprodukten	29
7.3.3. Kovalente Bindung von Stoffwechselprodukten im Darmgewebe	34
7.4. N-Nitrosodibutylamin (NDBA)	34
7.4.1. Verteilung der Gesamtradioaktivität	34
7.4.2. Entstehung und Verteilung von Stoffwechselprodukten	40
7.4.3. Kovalente Bindung von Stoffwechselprodukten im Darmgewebe	47
7.4.4. Ergebnisse mit antibiotisch vorbehandelten Ratten	47
IV. DISKUSSION	48
1. Vergleich der Resorption und der Stoffwechsel- kapazität von Jejunum- und Ileumsegmenten	48
1.1. Methodisch-kritische Vorbemerkungen	48
1.2. Resorption und Metabolismus von NDEA	49
1.3. Resorption und Metabolismus von NDPA	50
1.4. Resorption und Metabolismus von NDBA	52
2. Welche Rückschlüsse können aufgrund der Unter- suchungen in vitro auf die Abhängigkeit der metabo- lischen Umwandlung im Darm von der Polarität der angebotenen Substrate gezogen werden?	55
V. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	58
VI. LITERATURVERZEICHNIS	62

I. Problemstellung

Der menschliche und tierische Organismus kommt bei der Nahrungsaufnahme, außer mit lebenswichtigen bzw. ernährungsphysiologisch wertvollen Stoffen, auch mit Bestandteilen der Nahrung in Kontakt, die z.T. nicht nur wertlos, sondern auch schädlich sind und hat sich mit diesen auseinanderzusetzen.

Besonders die carcinogenen Eigenschaften vieler Substanzen in der Nahrung wurden in den letzten Jahren untersucht, wobei die Nitrosamine einen breiten Raum einnahmen. Jedoch wurde bisher noch relativ wenig über eventuelle Fähigkeiten des Darmes zur Metabolisierung und Pharmakokinetik von Nitrosaminen berichtet.

In der vorliegenden Arbeit sollten der Transport und Metabolismus von drei symmetrischen Dialkylnitrosaminen an nicht durchbluteten Darmsegmenten von Ratten untersucht werden. Dazu wurden Jejunum- und Ileumsegmente steigenden Dosen von Diethyl-, Dipropyl- und Dibutyl-nitrosamin ausgesetzt. Es sollte festgestellt werden, ob ein Metabolismus durch den Darm stattfindet und in welchem Maß dieser eventuelle Metabolismus von der Höhe der Dosierung abhängt.

II. Einleitung

Bei oraler Zufuhr von Fremdstoffen werden diese nach der Resorption über das venöse Blut von Magen, Dünndarm und Dickdarm mit der Pfortader zunächst der Leber zugeführt. Manche Fremdstoffe können in größerem Umfang verstoffwechselt werden, bevor sie über den großen Kreislauf an ihren Wirkort gelangen. Die Bedeutung dieses "first-pass-Metabolismus" durch die Leber ist in den letzten Jahren durch zahlreiche Untersuchungen belegt worden. In neuerer Zeit wurde aber auch auf die Bedeutung des Abbaus von Fremdstoffen beim Durchtritt durch die Mukosa hingewiesen, der unter Umständen nicht unerheblich zum "first-pass-effect" nach oraler Zufuhr beiträgt (1).



Die Dünndarmmucosa ist nicht nur die Eintrittspforte für oral aufgenommene Substanzen, sondern stellt auch eine Barriere und damit den ersten Platz der Abwehr gegen toxische Verbindungen dar (2). Nach Chhabra (3) besitzen die Enzyme für den Metabolismus von Fremdstoffen im Darm die gleichen biochemischen Eigenschaften wie in der Leber. Obwohl die Aktivitäten fremdstoffmetabolisierender Enzyme bezogen auf mikrosomales Protein in der Mukosa des Darms nur 15-50% im Vergleich zur Leber betragen, könnten die Länge des Darms und die Aufenthaltsdauer der Fremdstoffe im Darm ausschlaggebende Faktoren für die Beteiligung des Dünndarms am Gesamtstoffwechsel sein.

Die Biotransformation von lipophilen Fremdstoffen dient in erster Linie dazu, die Substanzen in besser wasserlösliche Metaboliten zu überführen und sie damit für die Niere ausscheidungsfähig zu machen. Diese Metaboliten können eine größere oder geringere Wirksamkeit haben als die Muttersubstanz. Das entspricht bei toxischen Substanzen einer Giftung bzw. Entgiftung. Sie verläuft meist in zwei Phasen. Die erste besteht aus einer Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse, wobei die Monooxygenasen die wichtigsten Enzyme hierfür darstellen. In der zweiten Phase kann es zu einer Konjugation z.B. mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Ameisensäure oder Glutathion kommen.

Fremdstoffmetabolisierende Enzyme sind im endoplasmatischen Retikulum der oberflächlichen Zellen der Darmmucosa enthalten, während die tieferen Schichten mit unreifen Zellen noch keine enzymatische Aktivität aufweisen. Die höchste enzymatische Aktivität wurde im Duodenum gefunden, während sie im Ileum schon relativ gering war (4). Es ist jedoch festgestellt worden, daß auch die Mucosa des Dickdarms zur Metabolisierung von Fremdstoffen, z.B. Benzpyrenen, Aflatoxin B1 und Nitrosaminen fähig ist (5).

Die Enzymtätigkeit im Darm wird stark von den zugeführten Substanzen beeinflusst. So ist z.B. die Konzentration des Cytochroms P-450 abhängig von der Eisenkonzentration im Darmlumen selbst, dagegen durch parenterale Gaben von Eisen nicht beeinflussbar (6). Ebenso nahm bei Hungerzuständen die Monooxygenaseaktivität am Dünndarm der Ratte

innerhalb von 24 Stunden ab, während eine sehr viel längere Zeit erforderlich war, um eine Aktivitätsänderung der Leberenzyme zu bewirken (6).

Es war überraschend festzustellen, daß bereits sehr feine Änderungen in der Nahrungszusammensetzung die intestinalen Enzyme beeinflussen konnten. In der Leber war dies in der Regel nur nach relativ höheren Mengen zugeführter Fremdstoffe möglich (7). Es mußte jedoch damit gerechnet werden, daß hohe Aktivitäten des fremdstoffmetabolisierenden Enzymsystems nicht nur einen Schutz bedeuten könnten, sondern daß auch eine Transformation in reaktivere Produkte im Sinne einer Giftung stattfinden könnte.

Untersuchungen ergaben, daß auch im Dünndarmepithel eine Konjugation von Fremdstoffen mit Glutathion möglich war. Im Unterschied zur Leber, bei der die mikrosomale Glutathion-S-Transferase beteiligt ist, findet beim Dünndarmepithel diese Konjugation zu 95% im Cytosol statt (8). Das Darmepithel besitzt also die Voraussetzungen, sich an der präsystemischen Inaktivierung von Pharmaka und/oder der Entgiftung von Fremdstoffen durch Konjugation mit Glutathion zu beteiligen. So wurden z.B. über 60% des auf der Mucosaseite angebotenen Salicylamids in vivo mit Glucuronsäure konjugiert (9). Mit Hilfe der Darmpfusion nach Fisher und Parsons (10) in vitro fanden Komp und Forth (11) eine hohe Stoffwechselrate für ein Röntgenkontrastmittel, Iopodat. Bei Konzentrationen von 3,2 bis 100 nMol Iopodat/ml Perfusat lag zwei Drittel bis drei Viertel der übergetretenen Radioaktivität in Form eines Glucuronsäurekonjugats vor.

Sehr niedrige Giftmengen, wie sie in der menschlichen Nahrung vorkommen, gelangen deshalb unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur in geringem Umfang vom Darm in die Leber. Der Darm könnte unter der Voraussetzung, daß es sich bei diesen Stoffwechselvorgängen auch wirklich um eine Entgiftung handelt, einen wesentlichen Schutzmechanismus gegenüber Nahrungsgiften darstellen.

Im Unterschied zur Leber verstoffwechselt der Darm Fremdstoffe häufig zu anderen Metaboliten, und dieser Stoffwechsel ist z.B. kaum durch Phenobarbital induzierbar (12).

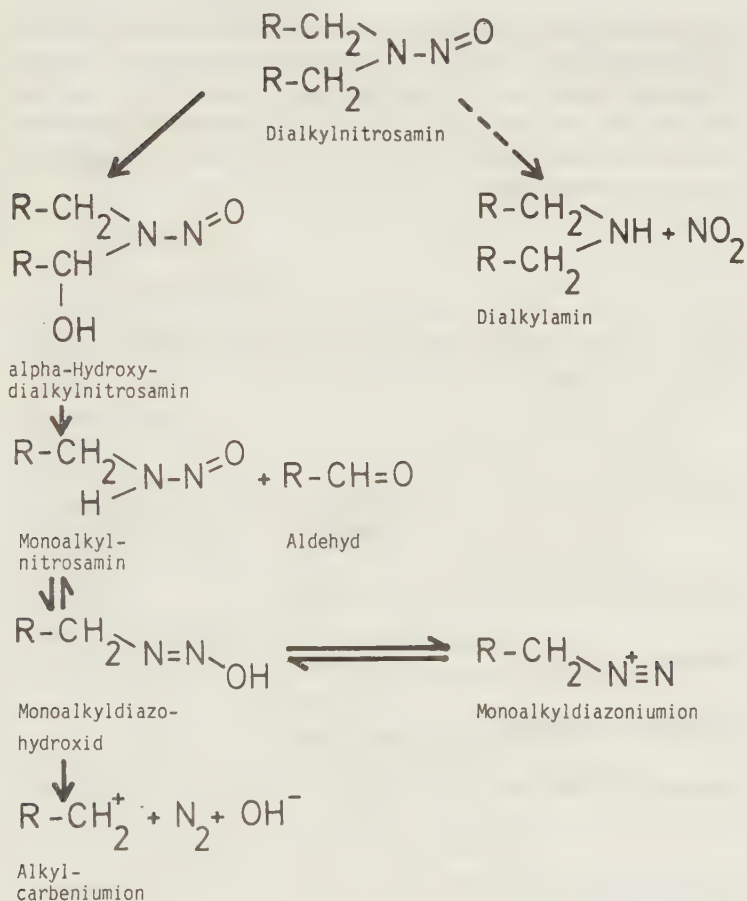
Zur Untersuchung der Mechanismen dieses präsystemischen Metabolismus durch die Mucosa des Darmes wurden Substanzen gesucht, die sich strukturell nur geringfügig voneinander unterscheiden und somit eine Möglichkeit bieten, die Bedeutung z.B. von Lipophilie, Ionisationsgrad und anderen Faktoren auf diesen Stoffwechsel zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang bot sich die Substanzklasse der Nitrosamine an, über deren Stoffwechselwege in anderen Organen schon viel bekannt ist, deren Metabolismus am Darm aber bisher weitgehend vernachlässigt wurde (13; 14).

Die Nitrosamine sind als carcinogene Substanzen seit langer Zeit erkannt und haben besonders in den letzten Jahren häufig Schlagzeilen als Umweltgifte gemacht. So wurden sie z.B. in Nahrungsmitteln, hier besonders in Wurst- und Fleischwaren, in dunklen Bieren, aber auch in Tabakrauch, in Pestiziden, als Verunreinigungen in Arzneimitteln und Kosmetika nachgewiesen. Ebenso kommen nicht unerhebliche Expositionen an bestimmten Arbeitsplätzen vor (15).

Nitrosamine sind Praekarzinogene, die nach heutigen Vorstellungen im Organismus durch mischfunktionelle Oxygenasen am α -C-Atom hydroxyliert und damit zu proximalen Carcinogenen aktiviert werden. Es konnte jedoch bisher das α -Hydroxydialkylnitrosamin selbst nicht nachgewiesen werden, da es offensichtlich zu instabil ist und unter Abspaltung eines Aldehyds zum Monoalkylnitrosamin wird. Letzteres steht im Gleichgewicht mit dem Monoalkyldiazohydroxid bzw. dem Monoalkyldiazoniumion. Daraus wird eine elektrophile Alkylkette, ein Carbeniumion, abgespalten, die schließlich nukleophile Zentren alkyliert. Nitrosamine wirken demzufolge nicht lokal sondern systemisch (13).

Entgiftungsreaktionen, z.B. die Denitrosierung unter Bildung von Nitrit und dem Dialkylamin, laufen ebenfalls über mischfunktionelle Oxygenasen (16). Ob die Prozesse der alpha-Hydroxylierung und der Denitrosierung allerdings wirklich so streng voneinander zu trennen sind, ist in letzter Zeit in Frage gestellt worden (17). Hier werden weitere Untersuchungen erst Aufklärung bringen müssen.



Alternative Stoffwechselfmöglichkeiten bei den von uns untersuchten symmetrischen Dialkylnitrosaminen stellen die Hydroxylierung an anderen C-Atomen, so z.B. am beta- C-Atom beim Nitrosodiethylamin sowie zusätzlich am omega-C-Atom beim Nitrosodipropylamin und Nitrosodibutylamin und beim omega-1-C-Atom beim Dibutylnitrosamin dar. Hier sind auch schon Entgiftungsreaktionen nachgewiesen worden, z.B. Glucuronidierungen oder andere Konjugationen, die zu wasserlöslichen Produkten führen, welche schnell ausgeschieden werden und damit im Organismus nicht mehr zur Alkylierung führen (18; 19; 20).

Mit zunehmender Kettenlänge verlieren die symmetrischen Dialkylnitrosamine an Giftigkeit, gewinnen jedoch an Lipophilie (Tab.1). Auch die karzinogene Potenz wird ab dem Diethylnitrosamin deutlich geringer (21; 23; 24). Es wäre zu überlegen, ob mit zunehmender Kettenlänge andere Stoffwechselreaktionen eine Rolle spielen, die zu einer Entgiftung führen können.

Tabelle 1: Akute Toxizität und Polarität von symmetrischen Dialkylnitrosaminen

Substanz	LD p.o. ^a (mg/kg)	Oktanol ^b p ----- Wasser
N-Nitroso-di-methylamin	40	0,27
N-Nitroso-di-ethylamin	280	3
N-Nitroso-di-n-propylamin	480	23
N-Nitroso-di-n-butylamin	1200	83

a. Akute Toxizität bei Ratten (21)

b. Polarität (22)

III. Eigene Untersuchungen

1. Abkürzungen

HPLC: Hochdruckflüssigkeitschromatographie

NDBA: Nitroso-di-n-butylamin

NDEA: Nitroso-di-ethylamin

NDPA: Nitroso-di-n-propylamin

R.A.: Radioaktivität

S/M-Quotient: Verhältnis der Konzentrationen einer Substanz zwischen
Resorbat (S=Serosaseite) und Perfusat (M=Mukosaseite)
nach Versuchsende

2. Material

2.1. Reagenzien

a. Acetonitril Lichrosolv

Merck

b. Äther, DAB 7

Merck

c. Aqua tridest

d. n-Butanol, p.a.

Merck

e. Cefoxitin-Natrium, 2,1g (Mefoxitin^R)

MSD Pharma

f. Chloroform p.a.

Merck

g. Elektrolytbestimmung: Lithium Stammlösung

für flammenphotometrische Serum-
analysen

Serum-Standard-Stammlösung

für flammenphotometrische Analysen

Eppendorf

- h. Folin-Ciocalteu-Reagenz
Merck
- i. Gentamycinsulfat, 66,7mg/ml (Refobacin^R)
Hoechst
- j. Glucose Bestimmung: 0,33n Perchlorsäure
Glucose GOD-Perid^R Methode
Boehringer
- k. Methanol p.a. und tech.
Merck
- l. Methoxyäthylamin tech.
BASF
- m. NDBA "kalt" ISOPAC N 5132
Sigma Chemie GmbH
- n. ¹⁴C-NDBA
1-¹⁴C-N-Nitroso-di-n-butylamin spezifische Aktivität 24,6
mCi/mmol; Reinheit > 99% (Dr. Wiessler, DKFZ, Heidelberg)
- o. NDEA "kalt" ISOPAC N 0756
Sigma Chemie GmbH
- p. ¹⁴C-NDEA
1-¹⁴C-N-Nitrosodiethylamin spezifische Aktivität 20,0
mCi/mmol; Reinheit > 97% (NEC-702)
New England Nuclear
- q. NDPA "kalt" ISOPAC N 5007
Sigma Chemie GmbH
- r. ¹⁴C-NDPA
1-¹⁴C-N-Nitroso-di-n-propylamin spezifische Aktivität 3
mCi/mmol, Reinheit > 99% (Dr. Wiessler, DKFZ, Heidelberg)
- s. Proteinbestimmung nach Markwell (26):
Lsg.A: 20g Na₂CO₃ (2%ig)
4g NaH₂PO₄ (0,4%ig)
1,6g K-Na-Tartrat (0,16%ig)
10g SDS (1%ig) auf 1 Liter
Lsg.B: 40g CuSO₄ x 5H₂O auf 1 Liter

t. Szintillationscocktail: 8,3g PPO

0,83g POPOP

650ml Xylol

200ml Triton X-100

150ml Methanol auf 1 Liter

Merck

u. Trichloressigsäure p.a.

Merck

v. Tyrodelösung: 8,0g NaCl

0,2g KCl

1,0g NaHCO₃

0,05g NaH₂PO₄

30,0g Glucosemonohydrat

0,2g CaCl₂ x 2H₂O

0,1g MgCl₂ x 6H₂O auf 1 Liter Aqua tridest

2.2. Geräte

a. Auswertungsprogramm, Multiplan für Apple II europlus
Microsoft GmbH

b. Flammenphotometer FCM 6341
Eppendorf

c. Fraktionssammler, Frac-100
Pharmacia

d. Ganzglas-Homogenisator nach Potter-Elvehjem, 5ml
Schütt

e. Glasperfusator modifiziert nach Fisher und Parsons (10)
Fa. Kugelstatte

f. Homogenisator Typ RW 18
Janke und Kunkel KG

g. HPLC-Pumpe, Constant Flow Pump, Model 600/200
Gyncotek

- h. HPLC-Trennsäule, 12,5cm Länge, 4,6mm i.D., gefüllt mit ODS 5 μ
als Sorbens
Bischoff Analystechnik
- i. Integrator, 3390 A
Hewlett Packard
- j. Liquid szintillation counter
LKB 1215 Rack Beta II Wallac
LKB
- k. Mikroliterspritzen, 20-500 μ l, Typ TLL
Hamilton
- l. Photometer 1101 M mit Absaugpumpe 4151
Eppendorf
- m. Probeaufgabeventil
Negretti & Zambra
- n. Radioaktivitäts-HPLC-Detektor, IM 2000 mit Apple II europlus
und Matrixdrucker Epson 80 F/T
Isomess
- o. Spectrophotometer, Sp-4
Gyncotek
- p. Thermostat, D3
Haake
- q. Vac-Elut-Vacuumgerät mit Bond-Elut-Extraktionssäulen (C18,
200mg)
ICT
- r. Waage
Mettler PC 440 Delta Range
- s. Zentrifuge, Typ-Nr. 4400
Heraeus-Christ GMBH

3. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ca. drei Monate alte weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittlerem Gewicht von 200 Gramm aus der Süd-deutschen Versuchstierfarm GmbH und Co.KG, Tuttlingen.

Die Tiere wurden bis zum Vortag des Versuches ad libitum gefüttert (Altromin 1321, Altrogge, Lage) und getränkt. Zur Abklärung der Bedeutung der natürlichen Darmflora für den Abbau von NDBA wurden 5 Ratten mit Antibiotika vorbehandelt. Sie bekamen dafür am ersten und zweiten Tag vormittags je 1ml Refobacin^R (entspricht: 40mg Gentamycin) und 1ml Mefoxitin^R (entspricht: 100mg Cefoxitin) per Schlundsonde eingegeben. Am dritten Tag wurden sie nüchtern gesetzt und wurden sowohl vormittags als auch nachmittags wie zuvor behandelt. Der Versuch fand am vierten Tag statt.

4. Versuchsdurchführung

Den Ratten wurde ca. 18 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen. Die Tiere hatten jedoch während dieser Zeit freien Zugang zum Trinkwasser.

4.1. Operation

Die Präparation der Darmsegmente erfolgte in Äthernarkose.

Den Ratten wurden von der Flexura duodenojejunalis nach distal (Jejunum) oder von der Plica ileocaecalis nach proximal (Ileum) ca. 10cm lange Darmstücke entnommen. An beiden Enden der Darmsegmente wurden Glaskanülen mit Schliffansätzen eingebunden und anschließend mit ca. 20ml physiologischer Kochsalzlösung durchgespült. Erst danach wurden die Darmabschnitte von der Blutversorgung abgetrennt und in die Durchströmungsanordnung nach der Methode von Fisher und Parsons (10) eingehängt.

4.2. Perfusion

Für die sehr wasserdampfvlüchtigen Nitrosamine wurde die von Rummel und Stupp (25) modifizierte Apparatur zu einer Ganzglasversion weiterentwickelt (Abb.1). Damit sollte sichergestellt werden, daß während der zweistündigen Perfusion keine undefinierbaren Verluste auftraten.

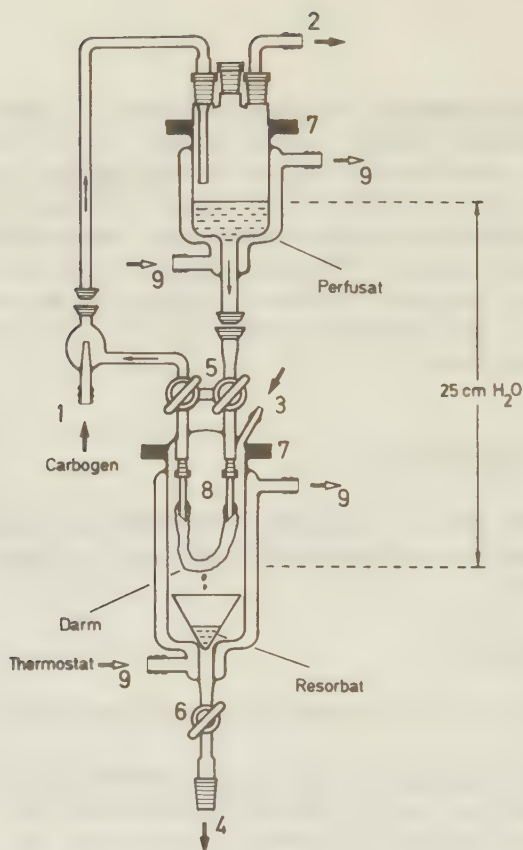


Abb. 1: Glasperfusator modifiziert nach Rummel und Stupp (25)

- 1: Zufuhr von Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) über Glasolive
- 2,3: Überleitung des Carbogens von der oberen Perfusionskammer (2) über einen Teflonschlauch (nicht eingezeichnet) in die untere Kammer (3)
- 4: Ableitung des Carbogens aus der unteren Perfusionskammer in die Waschflaschen (nicht eingezeichnet)
- 5: Dreiwegehähne aus Teflon
- 6: Zweiwegehahn aus Teflon
- 7: Planschliffverbindung zum Verschluß der Kammern
- 8: Glaskanülen
- 9: Die nicht ausgefüllten Pfeile kennzeichnen den Weg des thermostatisierten Wassers. Die Schlauchverbindungen sind nicht eingezeichnet.

Die beiden Gummistopfen für den Verschluß der oberen und unteren Perfusionskammer wurden durch Glasschliffverbindungen ersetzt. Durch zwei Dreiwegehähne wurde zusätzlich eine Möglichkeit geschaffen, die Perfusionslösung, 50ml Tyrodelösung mit 15 Mmol Glucose, vor Versuchsbeginn rezirkulieren zu lassen, um eine Erwärmung auf 37°C und eine optimale Sauerstoffanreicherung zu erzielen. Die Perfusionslösung wurde dabei, durch das über eine Glasolive zugeführte Gas (Carbogen = 5%CO₂ + 95%O₂), in Bewegung gehalten.

Die untere Kammer enthielt ein Spitzglas zum Auffangen der vom Darm resorbierten Flüssigkeit und wurde mit einem wassergesättigten Filterpapierstreifen feucht gehalten. Nach Einhängen des Darmsegmentes und Verschluß der unteren Kammer wurde die Perfusionslösung durch den Darm geleitet. Der Perfusionsdruck betrug ca. 25cm Wassersäule, d.h. bei einem 10cm langen Darmsegment maß der Abstand zwischen dem Flüssigkeitsspiegel in der oberen Kammer und dem unteren Ende des Darms ungefähr 25cm. Angefeuchtetes, erwärmtes Gasgemisch wurde jetzt von der oberen in die untere Kammer geleitet. Damit sollte eine ausreichende O₂-Versorgung und Befeuchtung des Darms auch von außen gewährleistet werden. Als Schlauchmaterial diente Teflon (7mm Außen-, 5mm Innendurchmesser, ca. 40cm lang), welches sich gegenüber den untersuchten Nitrosaminen als inertes Material erwies. Das in die untere Kammer eingeleitete Gasgemisch wurde dann durch drei Waschflaschen geleitet, die 15ml Butanol zum Auffangen wasserdampf-flüchtiger, lipophiler Begleitstoffe, 15ml Methoxyäthylamin zur Absorption von CO₂ und 15ml Aqua dest. enthielten.

Nachdem sichergestellt war, daß der Darm keine Undichtigkeiten aufwies und die beiden Kammern gasdicht verschlossen waren - das Gasgemisch perlt dann durch die Waschflaschen -, wurde das zu untersuchende Nitrosamin in einer geringen Menge Wasser (<1ml) gelöst und der oberen Kammer zugesetzt; die Uhrzeit wurde festgehalten.

Nach 2-stündiger Perfusion wurden die Hähne der Perfusionsapparatur wieder auf Rezirkulieren gestellt. Der Darm wurde durchtrennt und das durch die Darmstücke ablaufende Perfusat aufgefangen. Anschließend

wurden sowohl das Perfusat als auch das abgetropfte Resorbat gewogen und für die Radioaktivitätsmessung jeweils Doppelproben zu 100µl entnommen. Zusätzlich wurden für die Elektrolytbestimmung 50µl und für die Glucosemessung 100µl abgenommen. Der Darm wurde vor seiner Abnahme noch mit 2x5ml Aqua dest. gespült, welches in einem 50ml Messzylinder aufgefangen wurde. Anschließend wurden seine Länge und sein Gewicht bestimmt. Die Apparatur wurde nun 2x mit Methanol gespült, welches zusätzlich in dem 50ml Meßzylinder aufgefangen wurde. Von diesen 50ml wurden, ebenso wie aus der Butanolwaschflasche, 5ml zur Radioaktivitätsmessung abgenommen. Da nach der 2-stündigen Perfusionszeit nur noch ein Teil von den ursprünglich eingesetzten 15ml Methoxyäthylamin vorhanden war, wurde der Rest mit Szintillationscocktail auf 25ml aufgefüllt und auch davon 5ml zur Radioaktivitätsmessung abgenommen. In einzelnen Versuchen wurde auch die Radioaktivität im Wasser der dritten Waschflasche bestimmt. Es wurde jedoch in keinem Fall eine signifikant über dem Nullwert liegende Radioaktivitätsmenge nachgewiesen.

Bei dem Versuch mit antibiotisch vorbehandelten Ratten wurden zusätzlich 0,5ml-Proben der Tyrodelösung und vom Perfusat unmittelbar vor Zusatz der Radioaktivität und am Versuchsende für die Keimzahlbestimmung entnommen und in sterilen Polypropylenröhrchen eingefroren.

Der Darm wurde mit 2ml Aqua dest. gepottert; von dem Homogenat wurden anschließend 2x100µl für die Bestimmung der Gesamtradioaktivität, 50µl für die Proteinbestimmung nach Lowry und ca. 1ml für die Extraktion zur Bestimmung des Metabolitenanteils im Darm entnommen. Der Rest des Darmhomogenats wurde in Glasampullen eingeschweißt.

4.3. Blindversuch

Mit je einer Konzentration der untersuchten Nitrosamine wurde eine Versuchsserie ohne Darm durchgeführt. Die Perfusionslösung wurde 2 Stunden rezirkuliert. Danach wurden wie in 4.2. beschrieben Perfusat- und Waschflaschenproben für die Radioaktivitätsbestimmung gewonnen.

4.4. Kontrollversuche

Je 11 Darmsegmente von Jejunum und Ileum wurden nach der in 4.2. beschriebenen Weise jedoch ohne Zusatz von Nitrosaminen perfundiert. Am Versuchsende wurden Perfusat- und Resorbatproben für die Glucose- und Elektrolytbestimmung herangezogen.

5. Analytik

5.1. Glucosebestimmung

Das Resorbat wurde mit Aqua dest. 1:3 verdünnt. 100µl des verdünnten Resorbats, 100µl des Perfusats und 100µl Tyrodelösung wurden mit 1ml Perchlorsäure zur Enteiweißung gemischt und bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Vom Überstand wurden 200µl abgenommen, nach der Glucose GOD-Perid^R Methode nach Boehringer angesetzt und nach 30 Minuten in Absaugküvetten mit 1cm Schichtdicke bei 578nm gegen den Leerwert am Photometer bestimmt.

5.2. Elektrolytbestimmung

Die Messung der Elektrolyte Na, K und Ca in jeweils 50µl des Resorbats, des Perfusats und der Tyrode erfolgte nach Zugabe von 2,5ml Lithiumverdünnung an einem Eppendorf Flammenphotometer.

5.3. Proteinbestimmung nach modifizierter Lowry-Methode (26)

50µl Darmhomogenat (entsprechend 10-100µg Protein) wurden mit 1ml H₂O geschüttelt, anschließend mit 3ml Reagenz (100 Teile Lsg.A; 1 Teil Lsg.B) versetzt und nach 30 Minuten mit 0,3ml Folin-Ciocalteu-Reagenz geschüttelt. Nach 45 Minuten wurde die Extinktion bei 660nm gegen den Leerwert gemessen.

5.4. Radioaktivitätsbestimmung

Am Szintillationszähler wurde eine Quenchkurve mit Hilfe der externen Standardisierungsmethode durch Zusatz von steigenden Mengen Methoxy-äthylamin (0-5ml) zu 15ml Cocktail mit bekannter Radioaktivitätsmenge erstellt und abgespeichert.

Alle zu untersuchenden Proben wurden mit 10-15ml Szintillationscocktail gemischt und nach Eingabe des Nullwertes gemessen.

5.5. Untersuchung des Darmes auf Metaboliten

Ca. 1ml Darmhomogenat wurde mit 2ml Aqua dest. verdünnt und sodann in die Extraktionssäulen gegeben. Anschließend wurde mit 3 x 2ml Aqua dest. nachgespült. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde gewogen und zur Radioaktivitätsmessung 1ml abgenommen. Nun gaben wir in die Extraktionssäulen noch 3ml Methanol und danach 3ml Methanol-Chloroform (50:50). Von der gesamten nun aufgefangenen Flüssigkeit wurde im Szintillationsdetektor die Radioaktivität bestimmt.

5.6. Untersuchung auf kovalente Bindung von Radioaktivität im Darmgewebe

Ca 1ml Homogenat von NDPA- und NDPA-behandelten Jejunumsegmenten wurden in 10 ml-Zentrifugengläsern mit Schraubdeckeln eingewogen. Nach Zugabe von 1ml Trichloressigsäure (10% G/V) wurde kräftig geschüttelt, zentrifugiert und der wäßrige Überstand abgenommen. Das zurückbleibende Pellet wurde nochmals wie geschildert mit 1ml Trichloressigsäure und anschließend mit je 3ml Methanol-Wassergemisch (80/20), dann mit Methanol-Äthergemisch (50/50) und nochmals mit Methanol-Wassergemisch (80/20) extrahiert. Anschließend wurde das Pellet zwei Stunden mit 1ml Gewebelöser (Tetraethylammoniumhydroxydlösung) bei 70° C inkubiert und danach ebenso wie die fünf Extraktionsphasen auf ihren Radioaktivitätsgehalt im Szintillations-Zähler untersucht.

5.7. Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC)

Zur weiteren Aufklärung ob ein Metabolismus stattgefunden hatte, wurden die Proben einer analytischen Trennung an der HPLC unterzogen.

Die versuchstechnische Problematik bestand unter anderem darin, daß wegen der hohen Carcinogenität der Nitrosamine möglichst wenig damit hantiert werden sollte. Außerdem war durch die Flüchtigkeit der Substanzen, etwa beim Extrahieren bzw. Einengen, immer die Gefahr eines Verlustes gegeben. Deshalb bedienten wir uns der Vorsäulentechnik (Abb.2). Der Vorteil war, daß unfiltrierte Proben gemessen werden konnten, wenn sie nicht allzuviel Proteine oder grobe Verunreinigungen enthielten. Dies war z.B. bei unseren Perfusaten und Resorbaten möglich.

Die Probe, bis zu 200µl, wurde zunächst auf eine Vorsäule mit groben RP-18-Material, also Partikel mit ca. 40µ Durchmesser, aufgegeben. Die lipophilen Substanzen wurden am Anfang der Säule aufkonzentriert, während die wasserlöslichen Substanzen, also nicht nur eventuell gebildete Metaboliten, sondern vor allem störende Verunreinigungen, durch Nachspritzen von 200-500µl Wasser über die Vorsäule heruntergespült und aufgefangen wurden. Diese Spülflüssigkeit wurde auf Radioaktivität untersucht. Dann wurde durch Starten der HPLC-Analyse der Durchstrom durch die Vorsäule umgekehrt und die zurückgehaltenen Substanzen wurden von der Vorsäule auf die Trennsäule (RP-18-Material mit 5µ Partikelgröße) befördert. Sie konnten dort anhand ihrer Retentionszeit im UV-Detektor, in unserem Fall beim spezifischen Absorptionsmaximum von 233nm, sowie auch im Radioaktivitätsdurchflußdetektor bestimmt werden. Zusätzlich wurde das Eluat fraktioniert, um auch Radioaktivitätsmengen, die unterhalb der Nachweisgrenze des Radioaktivitätsmonitors liegen (etwa 300-400dpm pro Peak), noch nachweisen zu können.

Die Trennschärfe der analytischen Säule wurde durch die Vorsäulentechnik - trotz Einspritzung wesentlich höherer Mengen - nicht negativ

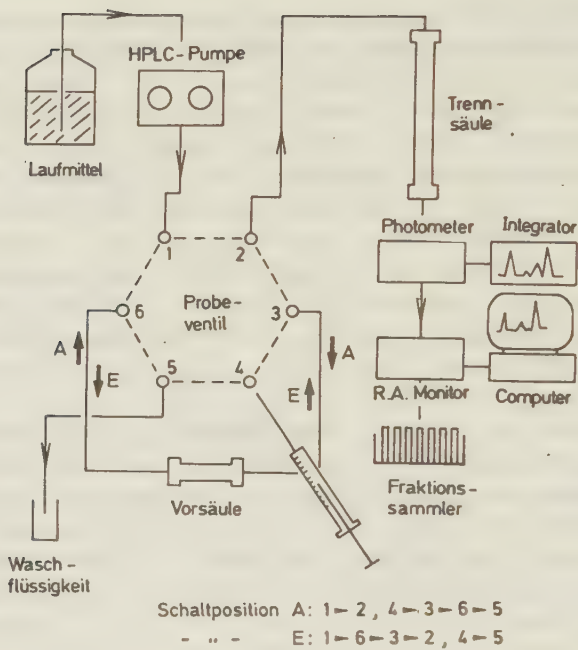


Abb. 2: Vorsäulenschalttechnik für HPLC-Analyse

beeinflusst, d.h. man erhielt die gleichen scharfen Peaks wie bei Verwendung einer 20µl Schleife.

Als Laufmittel bedienten wir uns eines Acetonitril-Wasser-Gemisches und zwar 10% Acetonitril beim NDEA, 40% Acetonitril beim NDPA und 50% Acetonitril beim NDPA.

5.8. Keimzahlbestimmung

Die Keimzahlbestimmung wurde dankenswerterweise von Herrn Apotheker R.Alex am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, durchgeführt. Die Tyrode- und Perfusatproben wurden zunächst auf Antibiotikaresten von der Vorbehandlung mit Hilfe eines Agar-Diffusionstest mit *B.subtilis* ATCC 6633 als Testkeim mit Gentamicinsulfat als Vergleichssubstanz untersucht. Die Nachweisgrenze betrug ca 0,02 µg/ml. Anschließend wurde die Gesamtkeimzahl in der verbliebenen Probelösung (98%) mit der Membranfiltermethode im Laminar-Air-Flow-Prinzip ermittelt (Filtrationseinheit SM 165 10 von Sartorius). Die Membranfilter mit Nährkartonscheiben (SM 140 05 ACK von Sartorius) wurden 7 Tage bei 37° C bebrütet.

6. Berechnung der Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Multiplan am Apple II europlus errechnet und tabellarisch dargestellt.

Der Gesamtanteil der Metaboliten an der Radioaktivität im Perfusat und Resorbat wurde durch Abzug der auf die Nitrosamin-Fraktion nach Hochdruckflüssigkeitschromatografischer Trennung entfallende Radioaktivität von der Gesamtradioaktivität bestimmt. Bei den Darmhomogenaten wurde die Radioaktivität in der über die Extraktionssäulen gewonnenen wässrigen Fraktion den Metaboliten, die organische Fraktion dem nicht verstoffwechselten Nitrosamin zugerechnet.

7. Ergebnisse

7.1. Vitalitätskriterien

Für die Überprüfung der physiologischen Leistungsfähigkeit isolierter, durchströmter Darmabschnitte nach der Methode von Fisher und Parsons (10) können als verlässliche Beurteilungskriterien herangezogen werden:

- a. der Glucosetransport, insbesondere der "Bergauftransport" im Jejunum
- b. die Netto-Wasserverschiebung - als eine Folge des aktiven Natriumtransportes - von der Mucosa- zur Serosaseite.

Aus den Tabellen 2 und 3 geht hervor, daß weder die Wasserresorptionsleistung noch der Transport von Glucose und Natrium in eindeutiger konzentrationsabhängiger Weise von den Nitrosaminen beeinflusst wurde.

7.2. N-Nitrosodiethylamin (NDEA)

Hinsichtlich der Resorption des NDEA ergab sich keinerlei Konzentrationsabhängigkeit (Tab.4). In allen Fällen wurde ein SM-Quotient von 1 festgestellt, d.h. im Resorbat war die gleiche Konzentration zu finden wie im Perfusat und dies galt sowohl für die Gesamtradioaktivität als auch für das NDEA selbst, denn es konnte weder im Perfusat noch im Resorbat bei der HPLC-Analyse ein Hinweis für einen Stoffwechsel gefunden werden. Auch die Konzentration im Darm, bezogen auf Feuchtgewicht, war gleich wie im Perfusat und im Resorbat.

Aus der Tabelle 4 geht hervor, daß nach 2 Stunden das meiste NDEA im Perfusat blieb; im Resorbat waren beim Jejunum etwa 3-4% der Radioaktivität zu finden. Beim Darm waren es weniger als 1%. In der ersten Waschflasche, die Butanol enthielt und von der anzunehmen war, daß sie unverändertes NDEA aufgefangen hatte, waren etwa 4-5% der Radioaktivität zu finden. In der zweiten, CO₂-absorbierenden Waschflasche war bei den beiden höheren Konzentrationen etwa 1% der Radioaktivität nachzuweisen, etwa gleich viel wie bei den Kontrollversuchen ohne Darm. Nur

Tabelle 2 Vitalitätskriterien für das Jejunum

Substanz (nMol/ml)	n	Wasser- transport (ml/cm) ^a	G L U C O S E		N A T R I U M	
			(μ Mol/cm) ^b	S/M ^c	(mMol/cm) ^b	S/M ^c
Kontrolle	11	0,244 $\pm$ 0,017	12,15 $\pm$ 0,83	4,73 $\pm$ 0,26	31,7 $\pm$ 2,3	0,871 $\pm$ 0,006
NDEA/0,126	6	0,242 $\pm$ 0,035	10,04 $\pm$ 2,29	3,23 $\pm$ 0,40	32,18 $\pm$ 4,4	0,894 $\pm$ 0,018
0,370	6	0,291 $\pm$ 0,023	16,44 $\pm$ 2,43	5,03 $\pm$ 0,71	40,70 $\pm$ 3,5	0,909 $\pm$ 0,016
1,92	6	0,267 $\pm$ 0,046	11,83 $\pm$ 0,95	4,88 $\pm$ 0,64	42,68 $\pm$ 7,7	1,026 $\pm$ 0,021
NDPA/1,18	7	0,171 $\pm$ 0,014 ^d	8,71 $\pm$ 0,93	5,42 $\pm$ 0,52	22,20 $\pm$ 1,9	0,872 $\pm$ 0,018
/1,83	6	0,126 $\pm$ 0,031 ^d	4,79 $\pm$ 1,62 ^d	3,49 $\pm$ 0,47	18,40 $\pm$ 3,8 ^d	0,975 $\pm$ 0,028 ^d
/6,48	7	0,194 $\pm$ 0,028	9,61 $\pm$ 1,47	5,13 $\pm$ 0,28	25,40 $\pm$ 3,6	0,871 $\pm$ 0,010
/21,3	5	0,205 $\pm$ 0,025	10,12 $\pm$ 1,52	4,90 $\pm$ 0,54	26,00 $\pm$ 3,3	0,856 $\pm$ 0,022
/89,7	6	0,170 $\pm$ 0,022	7,74 $\pm$ 1,30 ^d	4,43 $\pm$ 0,27	24,90 $\pm$ 3,3	0,924 $\pm$ 0,016 ^d
/387	5	0,198 $\pm$ 0,024	10,77 $\pm$ 1,21	5,51 $\pm$ 0,31	25,00 $\pm$ 3,0	0,868 $\pm$ 0,021
NDBA/0,011	4	0,233 $\pm$ 0,027	10,91 $\pm$ 0,80	4,35 $\pm$ 0,23 ^d	30,3 $\pm$ 3,6	0,879 $\pm$ 0,005
/0,319	5	0,212 $\pm$ 0,034	9,76 $\pm$ 1,48	4,53 $\pm$ 0,32	28,8 $\pm$ 4,6	0,905 $\pm$ 0,021
/0,98	6	0,263 $\pm$ 0,026	12,65 $\pm$ 1,17	4,24 $\pm$ 0,29	33,7 $\pm$ 3,4	0,825 $\pm$ 0,016 ^d
/3,41	8	0,240 $\pm$ 0,015	10,30 $\pm$ 0,37	3,84 $\pm$ 0,18	30,5 $\pm$ 2,2	0,872 $\pm$ 0,011
/12,8	5	0,312 $\pm$ 0,041	13,15 $\pm$ 0,62	4,00 $\pm$ 0,49	38,9 $\pm$ 5,5	0,843 $\pm$ 0,019
/57,4	6	0,301 $\pm$ 0,027	11,80 $\pm$ 1,10	3,64 $\pm$ 0,12	37,5 $\pm$ 3,2	0,851 $\pm$ 0,013
/230	5	0,161 $\pm$ 0,034	6,78 $\pm$ 1,57	4,30 $\pm$ 0,56	21,1 $\pm$ 4,6	0,923 $\pm$ 0,009 ^d
/730	6	0,260 $\pm$ 0,026	11,13 $\pm$ 1,27	4,56 $\pm$ 0,36	34,6 $\pm$ 3,6	0,902 $\pm$ 0,015

Jejunumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glas-perfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Pro cm Darm übergetretene Wassermenge (Resorbat)

b: Pro cm Darm übergetretene Glucose- bzw. Na⁺-Menge

c: Verhältnis zwischen der Glucose- bzw. Na⁺-Konzentration am Versuchsende im Resorbat (S = Serosasseite) und im Perfusat (M = Mucosasseite)

d: Signifikant verschieden von den Kontrollwerten ($p < 0,01$)

Tabelle 3 Vitalitätskriterien für das Ileum

Substanz	n	Wasser-transport	G L U C O S E		N A T R I U M	
(nMol/ml)		(ml/cm) ^a	(μMol/cm) ^b	S/M ^c	(mMol/cm) ^b	S/M ^c
Kontrolle	11	0,063±0,009	0,23±0,06	0,266±0,055	9,9±1,2	1,104±0,029
NDEA/0,370	5	0,195±0,017	1,19±0,27	0,510±0,030	31,62±2,7	1,110±0,050
/1,92	6	0,062±0,009	0,25±0,08	0,284±0,052	13,63±2,8	1,287±0,034
NDPA/1,18	6	0,070±0,013	0,28±0,10	0,307±0,083	11,10±2,2	1,086±0,017
/1,83	3	0,071±0,013 ^e	0,08±0,03	0,077±0,019	15,10±1,0	1,212±0,048
/6,48	5	0,072±0,025	0,55±0,29	0,443±0,147	10,60±4,1	0,833±0,209
/21,3	6	0,068±0,014	0,26±0,08	0,331±0,106	10,80±2,2	1,016±0,012
/89,7	4	0,035±0,006 ^f	0,16±0,03	0,290±0,083	7,40±1,2	1,013±0,045
/387	5	0,059±0,014	0,20±0,06	0,267±0,037	9,40±2,2	1,052±0,016
NDBA/0,319	5	0,069±0,025	0,33±0,11	0,407±0,047	10,2±3,5	1,078±0,031
/0,791	5	0,120±0,024	0,36±0,11	0,191±0,029	19,9±4,1 ^d	1,099±0,019
/2,48	6	0,085±0,015	0,52±0,29	0,468±0,324	13,9±2,4	1,089±0,087
/11,7	5	0,094±0,014	0,31±0,10	0,231±0,073	14,7±2,2	1,075±0,030
/57,4	6	0,085±0,015	0,48±0,18	0,358±0,098	13,2±2,3	1,085±0,021
/230	3	0,084±0,034 ^f	1,13±0,21 ^d	0,545±0,114	27,9±1,1 ^d	1,066±0,011

Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glas-perfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Pro cm Darm übergetretene Wassermenge (Resorbat)

b: Pro cm Darm übergetretene Glucose- bzw. Na⁺-Menge

c: Verhältnis zwischen der Glucose- bzw. Na⁺-Konzentration am Versuchsende im Resorbat (S = Serosaseite) und im Perfusat (M = Mucosaseite)

d: Signifikant verschieden von den Kontrollwerten ($p < 0,01$)

e: n = 4

f: n = 7

Tabelle 4 Prozentuale Verteilung der Radioaktivität nach Perfusion mit 14-C-NDEA

Konzentration (nMol/ml)	n	Perfusat ^a	Resorbat ^a	Darm ^a	Waschflaschen ^a		S/M ^b
					BuOH	CO ₂	
ohne Darm							
1,61	4	93,80±1,38	---	---	2,08±0,44	1,40±0,27 ^e	---
Jejunum							
0,126	6	83,92±0,53 ^c	4,14±0,54	0,77±0,06	3,80±0,36	2,72±0,08 ^c	0,94±0,02
0,370	9	85,71±1,44 ^c	4,44±0,37	0,88±0,06	4,40±0,32	1,08±0,14 ^d	0,96±0,03
1,92	4	78,09±1,74 ^d	2,98±0,32	0,84±0,08	4,42±1,55	0,99±0,23 ^d	1,00±0,03
Ileum							
0,37	6	82,20±1,60	3,65±0,36 ^c	1,41±0,09	4,17±0,32	0,91±0,16	0,98±0,02
1,92	6	81,98±2,82	1,33±0,29 ^d	1,09±0,06	5,47±1,04	1,09±0,21	0,93±0,02

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Radioaktivitätsmenge in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität
b: Verhältnis zwischen der Konzentration der Radioaktivität im Resorbat (S = Serosaseite) und im Perfusat (M = Mucosaseite).

c,d: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

e: Signifikant verschieden von den Werten, die nach Perfusion von Jejunumsegmenten mit 0,126 nMol/ml erhalten wurden ($p < 0,001$).

bei der niedrigsten Konzentration war mit 2,7% ein etwas höherer Wert zu messen, der vielleicht für eine gewisse Verstoffwechselung bei dieser niedrigen Konzentration spricht.

Beim Ileum zeigten sich die gleichen Verhältnisse. Fast die gesamte Radioaktivität war im Perfusat verblieben. Der Übertritt ins Resorbat war bei den entsprechenden Konzentrationen etwas geringer als im Jejunum. Dies war nicht verwunderlich, da hier auch die Resorptionsleistung, also der Wasserdurchtritt, niedriger war.

Bei der Aufsummierung der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität kam man zu befriedigenden Ergebnissen. Es wurden im Schnitt $95 \pm 4\%$ der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden.

7.3. N-Nitrosodipropylamin (NDPA)

7.3.1. Verteilung der Gesamtradioaktivität

Bei der Prüfung des Übertritts von NDPA wurde im Jejunum eine Akkumulation der Radioaktivität im Resorbat beobachtet (Tab.8). Sie war umgekehrt proportional zur Dosis. Bei Perfusion mit ca. 1 nMol NDPA/ml ergab sich eine 1,8 fach höhere Konzentration im Resorbat als im Perfusat, während ab 90 nMol NDPA/ml, der zweithöchsten Konzentration, keine Anreicherung mehr zu verzeichnen war. Ileumsegmente konnten im geprüften Konzentrationsbereich dagegen die Radioaktivität nicht im Resorbat akkumulieren.

Betrachtet man die Verteilung der Radioaktivität am Versuchsende (Tab.5), dann zeigte sich nur eine schwache Konzentrationsabhängigkeit beim Übertritt der Radioaktivität in das Jejunum. Bei der Aufnahme im Darm und der im Perfusat verbleibenden Radioaktivität war bei beiden Darmsegmenten keine Konzentrationsabhängigkeit erkennbar, ebenso beim Resorbat von Ileumsegmenten. Das gleiche galt für die Radioaktivität in der Butanol enthaltenden ersten Waschflasche, in der sich 10-15% der eingesetzten Radioaktivität wiederfanden. In der zweiten, CO₂-absorbierenden Waschflasche ergab sich dagegen ein erster Hinweis

Tabelle 5 Prozentuale Verteilung der Radioaktivität nach Perfusion mit 14-C-NDPA^a

Konzentration (nMol/ml)	n	Perfusat	Resorbat	Darm	Waschflaschen	
			ohne Darm		BuOH	CO ₂
6,48	4	81,65±2,14			14,62±2,68	0,19±0,06 ^f
Jejunum						
1,18	7	69,34±0,83 ^b	4,56±0,52	2,30±0,26	12,72±0,40	5,07±0,63 ^{b,c}
1,83	6	75,55±1,23 ^c	3,04±0,95	2,71±0,18	13,33±1,20	4,74±0,29 ^b
6,48	7	73,42±1,63 ^{b,c}	4,68±0,87	2,93±0,31	10,46±0,93	4,77±0,33 ^b
21,3	5	71,15±1,23 ^{b,c}	3,93±0,84	2,16±0,14	11,96±1,93	3,07±0,35 ^{c,d}
89,7	6	73,87±1,68 ^{b,c}	2,61±0,33	2,92±0,55	12,02±1,30	2,15±0,32 ^{d,e}
387	5	75,96±1,89 ^c	2,83±0,35	2,17±0,31	13,84±0,94	1,08±0,17 ^e
Ileum						
1,18	6	75,32±1,47	1,22±0,20	3,32±0,31 ^b	13,41±2,24	0,59±0,11 ^b
1,83	4	78,54±1,68	1,19±0,19	3,87±0,57 ^{b,c}	16,83±1,70	0,26±0,06 ^{b,c}
6,48	5	71,13±1,65	1,48±0,58	5,77±0,42 ^c	14,93±2,67	0,24±0,07 ^{b,c}
21,3	6	73,07±1,96	1,07±0,20	3,64±0,32 ^b	15,76±1,92	0,30±0,06 ^{b,c}
89,7	7	74,23±1,66	0,54±0,96	4,16±0,56 ^{b,c}	16,83±1,61	0,44±0,07 ^b
387	5	79,48±3,07	1,12±0,24	3,86±0,52 ^{b,c}	15,41±2,32	0,12±0,01 ^c

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Radioaktivitätsmenge in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität
b-e: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

f: Signifikant verschieden von den Werten, die nach Perfusion von Jejunumsegmenten ($p < 0,01$) und nach Perfusion mit 1,18 und 89,7 nMol/ml bei Ileumsegmenten ($p < 0,05$) erhalten wurden.

Tabelle 6 Prozentualer Anteil der Metaboliten an der Gesamtradioaktivität nach Perfusion mit 14-C-NDPA^a

Konzentration (nMol/ml)	n	Perfusat	Resorbat	Darm
Jejunum				
1,18	7	25,15±3,18 ^b	60,10±4,63 ^b	28,92±2,40 ^b
1,83	6	16,32±1,53 ^b	49,06±5,53 ^{b c}	19,04±4,27 ^{b c d}
6,48	7	18,62±4,36 ^{b c}	51,31±2,45 ^{b c}	17,74±2,53 ^c
21,3	5	9,04±0,96 ^c	36,14±5,04 ^{c d}	15,77±2,78 ^{c d}
89,7	6	7,33±1,00 ^c	20,70±2,27 ^d	7,66±1,33 ^{d e}
387	5	5,58±0,69 ^c	8,96±1,23 ^e	3,12±0,39 ^e
Ileum				
1,18	6	14,32±1,61 ^b	21,93±2,20 ^b	4,78±0,76 ^b
1,83	4	7,15±0,42 ^c	20,64±1,65 ^b	4,62±0,67 ^b
6,48	5	6,54±1,24 ^{c d}	16,65±2,15 ^{b c}	2,78±0,35 ^{b c}
21,3	6	6,62±3,13 ^{b c d}	12,18±1,32 ^c	4,22±0,69 ^b
89,7	7	4,40±0,43 ^d	7,19±0,47 ^d	1,92±0,33 ^{c d}
387	5	3,86±0,34 ^d	4,97±1,04 ^d	0,95±0,17 ^d

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Auf Metabolite entfallende Radioaktivitätsmenge in Prozent der am Versuchsende in der Fraktion enthaltenen Gesamtradioaktivität

b-e: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

Tabelle 7 Summe der vom Darm gebildeten Metaboliten nach Perfusion mit 14-C-NDPA^a

Konzentration (nMol/ml)	n	Perfusat	Resorbat	Darm	Waschflasche CO ₂	Gesamt ^b
Jejunum						
1,18	7	17,35±2,08 ^c	2,85±0,51 ^c	0,66±0,08 ^c	5,07±0,63 ^{cd}	25,93±2,85 ^c
1,83	6	12,28±1,02 ^c	1,72±0,73 ^{cd}	0,48±0,09 ^{cd}	4,74±0,29 ^c	19,22±1,74 ^c
6,48	7	13,84±3,52 ^{cd}	2,38±0,45 ^c	0,50±0,06 ^c	4,77±0,33 ^c	21,49±3,48 ^{cd}
21,3	5	6,43±0,67 ^d	1,57±0,54 ^{cd}	0,34±0,06 ^{cd}	3,07±0,35 ^{de}	11,42±1,41 ^{de}
89,7	6	5,40±0,72 ^d	0,57±0,13 ^d	0,20±0,03 ^d	2,15±0,32 ^{ef}	8,32±0,93 ^{ef}
387	5	4,23±0,50 ^d	0,26±0,06 ^d	0,06±0,01 ^e	1,08±0,17 ^f	5,62±0,57 ^f
Ileum						
1,18	6	10,76±1,17 ^c	0,26±0,05 ^{cd}	0,15±0,02 ^c	0,59±0,11 ^c	11,77±1,10 ^c
1,83	4	5,61±0,35 ^d	0,24±0,03 ^d	0,17±0,03 ^c	0,26±0,06 ^{cd}	6,28±0,37 ^d
6,48	5	4,59±0,79 ^{de}	0,24±0,10 ^{cde}	0,16±0,03 ^c	0,24±0,07 ^{cd}	5,24±0,91 ^{de}
21,3	6	4,72±2,17 ^{cde}	0,13±0,02 ^c	0,16±0,03 ^c	0,30±0,06 ^{cd}	5,30±2,18 ^{cde}
89,7	7	3,26±0,31 ^e	0,04±0,01 ^e	0,08±0,02 ^{cd}	0,44±0,07 ^c	3,82±0,35 ^e
387	5	3,09±0,37 ^e	0,05±0,01 ^e	0,04±0,01 ^d	0,12±0,01 ^d	3,30±0,38 ^e

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s$)

a: Auf Metabolite entfallende Radioaktivitätsmenge am Versuchsende in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität

b: Summe aus Perfusat, Resorbat, Darm und CO₂-absorbierende Waschflasche

c-f: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

Tabelle 8: Transfer der Radioaktivität und der auf Originalsubstanz und Metabolite entfallenden Anteile nach Perfusion mit 14-C-NDPA

Konzentration (nMol/ml)	n	Gesamt-R.A.	S/M^a Originalsubstanz	Metabolite
Jejunum				
1,18	7	1,793±0,139 ^b	0,90±0,04 ^{b,c}	4,42±0,38 ^b
1,83	6	1,517±0,112 ^b	0,89±0,05 ^{b,c}	4,75±0,76 ^b
6,48	7	1,450±0,068 ^b	0,87±0,02 ^b	4,95±0,83 ^b
21,3	5	1,256±0,111 ^{b,c}	0,86±0,02 ^b	5,18±0,84 ^b
89,7	6	1,043±0,029 ^c	0,89±0,01 ^b	3,13±0,50 ^{b,c}
387	5	0,994±0,010 ^c	0,96±0,01 ^c	1,64±0,21 ^c
Ileum				
1,18	6	1,091±0,037 ^{b,c}	0,99±0,04	1,79±0,30 ^b
1,83	4	1,191±0,032 ^b	1,02±0,02	3,43±0,15 ^b
6,48	5	1,079±0,020 ^{b,c}	0,96±0,03	3,01±0,51 ^{b,c}
21,3	6	1,002±0,079 ^{b,c}	0,96±0,10	3,11±0,63 ^{b,c}
89,7	7	1,037±0,024 ^c	1,01±0,02	1,74±0,13 ^b
387	5	1,037±0,018 ^c	1,02±0,02	1,28±0,17 ^b

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Verhältnis der Konzentrationen im Resorbat (S = Serosaseite) und im Perfusat (M = Mucosaseite)

b,c: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

auf eine Verstoffwechselung von NDPA durch den Rattendarm. Im Vergleich zum Kontrollversuch ohne Darm wurden beim Jejunum stets signifikant höhere Radioaktivitätsmengen gefunden und zwar bei der höchsten Konzentration ca. 4 mal mehr und umgekehrt proportional zur Dosis steigend bis zu 20 mal mehr bei der niedrigsten Konzentration. Beim Ileum waren dagegen nur bei der niedrigsten und der zweithöchsten Konzentration gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Werte gegeben.

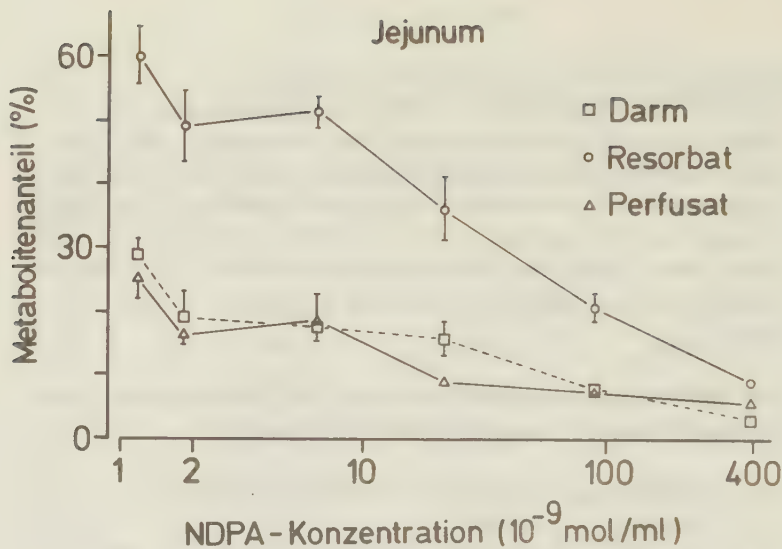
Nach Aufsummierung gelangte man wie bei NDEA mit $96 \pm 3\%$ zu einer hohen Wiederauffindungsrate der eingesetzten Radioaktivität.

7.3.2. Entstehung und Verteilung von Stoffwechselprodukten

Bei der HPLC-Analyse von Resorbat und Perfusat zeigte sich, daß beide Darmabschnitte in der Lage waren NDPA zu hydrophilen Metaboliten abzubauen (Abb.3; Tab.6). Der Metabolitenanteil nahm mit steigender Konzentration signifikant ab und war im Resorbat 2-3 mal so hoch wie im Perfusat. Die Jejunumsegmente besaßen generell eine höhere Stoffwechselaktivität im Vergleich zu Ileumsegmenten, die in dem 1,5-2 fach bzw. 2-3 fach höheren Metabolitenanteil im Perfusat bzw. Resorbat ihren Ausdruck fanden. Im Darmgewebe entfielen beim Jejunum etwa gleich viele Anteile der Radioaktivität auf hydrophile Metaboliten wie im Perfusat, während beim Ileum signifikant geringere Anteile als im Perfusat gefunden wurden (Abb.3; Tab.6).

Betrachtet man die Gesamtmenge von hydrophilen Metaboliten in Prozent der eingesetzten Menge, die von den beiden Darmabschnitten in 2 Stunden gebildet wurden, dann war wiederum eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit erkennbar (Tab.7). Während bei der niedrigsten Konzentration 26% bzw. 12% von Jejunum- bzw. Ileumsegmenten verstoffwechselt wurden, waren es bei der höchsten Konzentration nur noch 5,6 bzw. 3,3%. Der Gesamtmetabolismus nahm jedoch nicht in gleichen Maße ab, wie die Konzentration zunahm, d.h. im untersuchten Konzentrationsbereich wurde keine Sättigung der Stoffwechselkapazität der Darmabschnitte erreicht. Trotz der bis zu 5- bzw. 3,5-fachen Anreicherung

Jejunum



Ileum

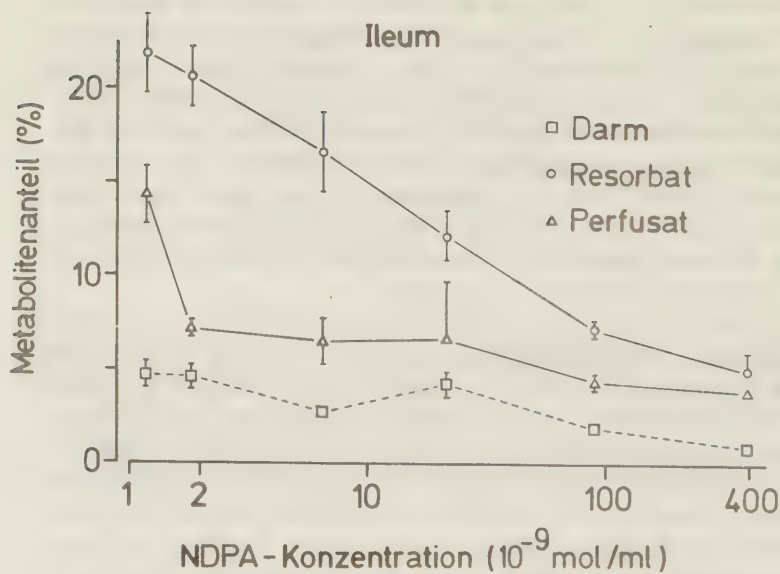


Abb. 3: Metabolisierungsrate von ^{14}C -NDPA in Jejunum- und Ileum segmenten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 4-7 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm \text{S}\bar{x}$).

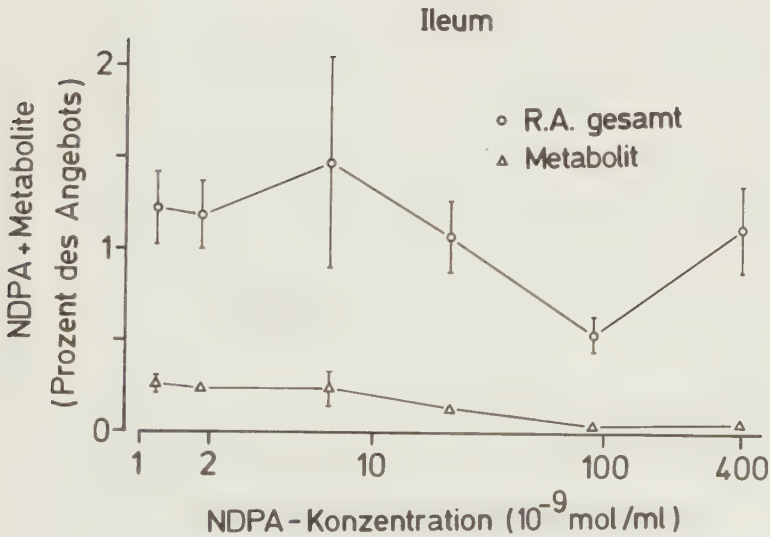
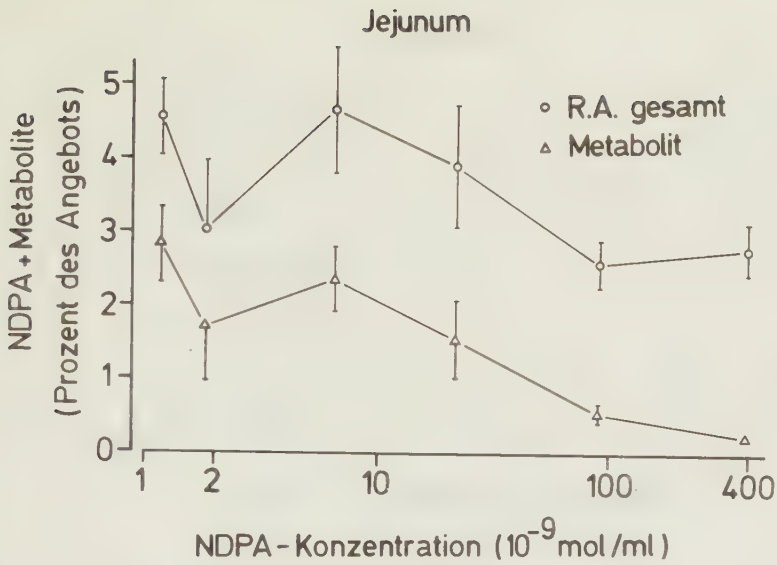


Abb. 4: Transfer von ^{14}C -NDPA und Metaboliten in Prozent des Angebots in Jejunum- und Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 4-7 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

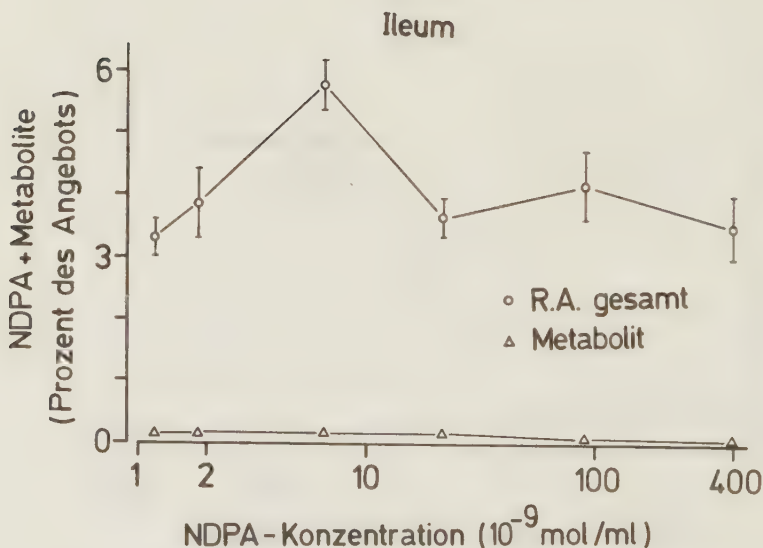
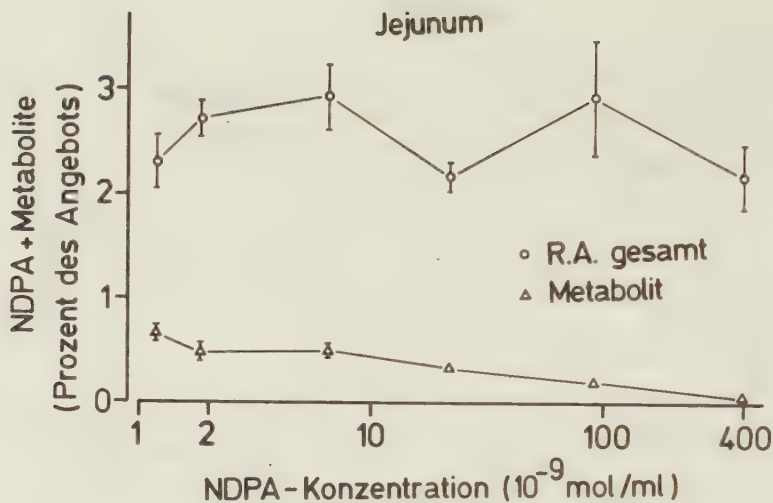


Abb. 5: Gehalt von ^{14}C -NDPA und Metaboliten in Prozent des Angebots im Gewebe von Jejunum- und Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 4-7 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

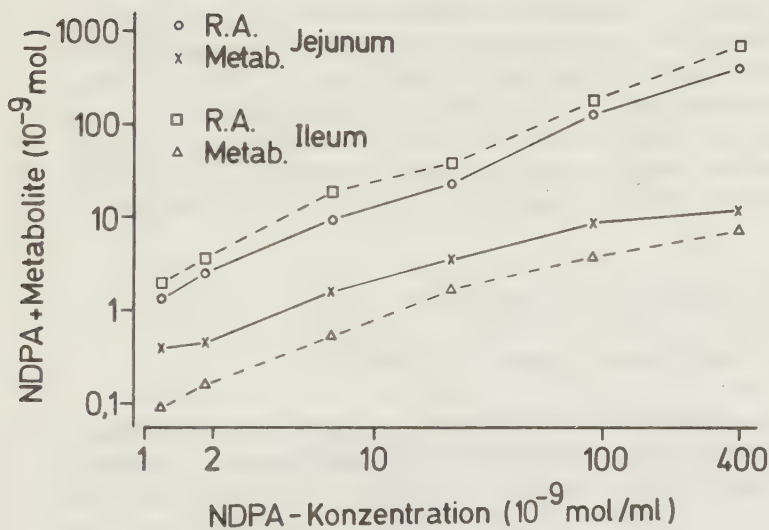
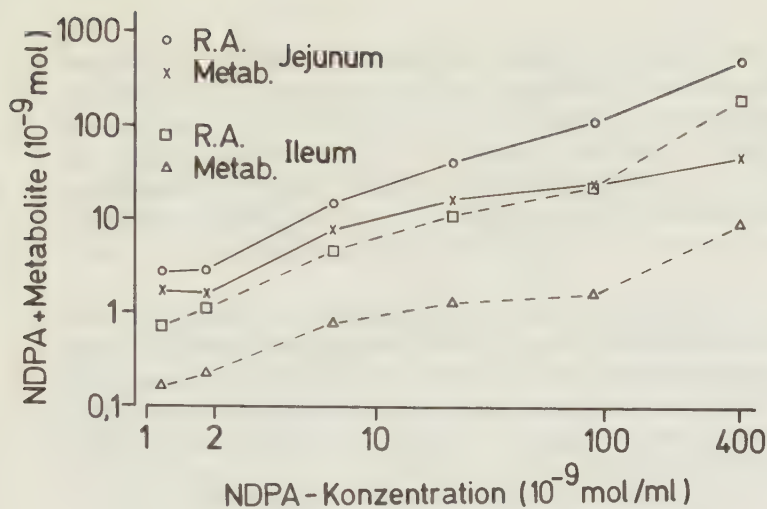


Abb. 6: Gesamttransfer in das Resorbat (oben) und Gesamtgehalt im Darmgewebe (unten) von ^{14}C -NDPA und Metaboliten bei Jejunum- und Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten von 4-7 Einzelversuchen.

der Metabolite im Resorbat gegenüber dem Perfusat bei Jejunum- bzw. Ileumsegmenten (Tab.8) wurden aufgrund des wesentlich höheren Volumens im Perfusat beim Jejunum ca. $\frac{2}{3}$, beim Ileum sogar $\frac{4}{5}$ der insgesamt gebildeten Metaboliten gefunden (Tab.7). Die zweithöchste Menge entfiel auf die CO_2 -absorbierende Waschflasche, gefolgt vom Resorbat und dem Darmgewebe, das beim Jejunum stets die geringste Menge, beim Ileum dagegen vergleichbare Mengen wie im Resorbat enthielt.

Verglich man die ins Resorbat übergetretenen bzw. im Darm aufgenommenen Radioaktivitätsmengen in Prozent des Angebots mit den auf Metaboliten entfallenden Anteilen, dann zeigte sich eine deutliche Abnahme des Metabolitenanteils mit zunehmender Konzentration. Bei der Gesamtradioaktivität war dagegen im Resorbat nur eine geringfügige und im Darm keine Abnahme zu sehen (Abb.4 und 5).

7.3.3. Kovalente Bindung von Stoffwechselprodukten im Darmgewebe

Die kovalente Bindung wurde in Homogenaten von Jejunumsegmenten nach Perfusion mit 6,48 nMol NDPA/ml untersucht. Der Metabolitenanteil betrug bei dieser Konzentration ca. 18% (Tab.6). In den Pellets wurde nach Proteinfällung und Extraktion mit Trichloressigsäure und lipophilen Lösungsmitteln $3,8 \pm 1,0\%$ der Radioaktivität gefunden. Dies entsprach ca. 20% des Metabolitengehalts im Darm, 0,47% der vom Darm insgesamt gebildeten Metaboliten und ca. 0,1% der applizierten Dosis.

7.4. N-Nitrosodibutylamin (NDBA)

7.4.1. Verteilung der Gesamtradioaktivität

Bei Perfusion mit NDBA konnte man im Jejunum, ebenso wie bei NDPA, eine Anreicherung der Radioaktivität im Resorbat feststellen (Tab.12). Sie war gleichfalls umgekehrt proportional zur Dosis und trat noch entschieden deutlicher auf als beim NDPA. Bei Perfusion mit einer Konzentration von ca. 0,01 nMol NDBA/ml war im Resorbat eine 6,5 fach höhere Radioaktivitätskonzentration als im Perfusat feststellbar. Erst

bei der höchsten Konzentration, nämlich 730 nMol NDBA/ml, ergab sich mit einem S/M-Quotienten von ca. 1 keine Akkumulation mehr im Resorbat. Bei den Ileumsegmenten war im Gegensatz zum NDPA ebenfalls eine deutliche Anreicherung der Radioaktivität im Resorbat feststellbar. Bei Perfusion mit 0,3 nMol NDBA/ml ergab sich eine ca. 3 fach höhere Konzentration im Resorbat als im Perfusat. Bei 230 nMol/ml war nur noch eine 1,2 fache Anreicherung zu verzeichnen.

Die Radioaktivitätsverteilung nach 2-stündiger Perfusion (Tab.9) ergab eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit im Perfusat und Resorbat. Im Jejunum war im Perfusat eine Abnahme von ca. 70% bei der niedrigsten Konzentration bis ca. 47% bei der höchsten Konzentration meßbar. Im Resorbat bewegte sich die Abnahme von ca. 20% der Radioaktivität bei der niedrigsten bis ca. 3% bei der höchsten Konzentration. Beim Ileum war die Konzentrationsabhängigkeit im Perfusat noch deutlicher. Sie bewegte sich von 77% bei 0,3nMol/ml bis 45% bei 230nMol/ml im Perfusat, während die Werte im Resorbat deutlich niedriger lagen als beim Jejunum und auch keine so deutliche konzentrationsbedingte Abnahme feststellbar war. Die Werte lagen zwischen ca. 1% und 3% der Radioaktivität. In der Butanol enthaltenden ersten Waschflasche fanden sich 11-25% der eingesetzten Radioaktivität wieder. Die niedrigen Werte (2,5-7%) in einigen Versuchen ergaben sich durch Verluste von NDBA infolge eines ungünstigen Materials des überleitenden Schlauches. Nach vergleichenden Versuchen mit Teflonschläuchen stieg die Radioaktivitätsrate in den Butanolwaschflaschen signifikant an und es konnten Wiederauffindungsraten von über 90% erzielt werden. In der CO₂-absorbierenden zweiten Waschflasche wurden im Vergleich zum Kontrollversuch ohne Darm beim Jejunum deutlich höhere Werte gefunden; zwischen 0,7 und 5% der Dosis gegenüber 0,25% der Dosis bei der Kontrolle. Beim Ileum wurde nur bei der niedrigsten Konzentration eine signifikant höhere Radioaktivitätsmenge gemessen als bei der Kontrolle. Die Werte sanken mit zunehmender Konzentration deutlich ab und waren bei den drei höchsten Konzentrationen vergleichbar mit den Werten der Kontrollversuche.

Konzentration (nMol/ml)	n	Perfusat	Resorbat	Darm	Waschflaschen	
		ohne Darm			BuOH	CO ₂
41,81	4	59,53±6,52	---	---	24,69±5,95	0,24±0,05 ^h
Jejunum						
0,011	4	69,12±3,92 ^{b,c}	19,38±3,04 ^b	13,88±1,53 ^b	18,90±4,20 ^b	1,97±0,27 ^{b,c}
0,319	5	61,71±2,39 ^{b,c}	13,26±1,81 ^{b,c}	4,96±0,31 ^c	15,68±4,78 ^{b,c}	1,69±0,22 ^c
0,980	6	69,68±2,72 ^b	10,00±0,80 ^c	2,99±0,13 ^d	2,65±0,65 ^{c,d}	2,56±0,46 ^{b,c}
3,41	8	60,16±3,05 ^{b,c,f}	9,08±0,62 ^c	2,82±0,26 ^d	2,55±0,55 ^d	1,92±0,19 ^c
12,8	5	55,74±2,36 ^{c,g}	9,14±0,76 ^c	4,07±0,21 ^c	3,20±0,56 ^{c,d}	3,00±0,28 ^b
57,4	6	45,34±0,82 ^{d,e}	4,58±0,39 ^d	4,36±0,33 ^c	7,67±2,25 ^b	5,16±0,24 ^d
230	5	47,46±5,43 ^{c,e}	2,41±0,49 ^e	9,34±0,50 ^b	24,46±8,10 ^{b,c}	3,12±0,49 ^{b,c}
730	6	46,64±3,52 ^{e,f,g}	2,59±0,21 ^e	9,16±0,75 ^b	18,63±4,05 ^b	0,72±0,06 ^e
Jejunum von mit Antibiotika behandelten Ratten						
2,24	5	61,83±4,94	12,08±1,73	4,29±0,42 ⁱ	13,68±6,11	1,03±0,11 ⁱ
Ileum						
0,319	6	76,82±4,15 ^b	2,89±0,89 ^{b,c}	6,18±0,75 ^b	11,23±2,61 ^{b,d}	0,58±0,06 ^b
0,791	6	63,32±2,48 ^b	1,82±0,29 ^{b,c}	3,34±0,27 ^c	4,83±1,01 ^b	0,43±0,11 ^b
2,48	5	62,96±2,69 ^{b,c}	2,38±0,23 ^c	3,35±0,09 ^{b,c}	26,64±1,78 ^c	0,39±0,06 ^{b,c}
11,7	5	60,23±2,94 ^{b,c}	1,87±0,25 ^{b,c}	11,9±0,48 ^d	23,00±2,95 ^{c,d}	0,26±0,09 ^{b,c}
57,4	6	50,22±2,92 ^{c,d}	1,10±0,17 ^b	13,0±0,72 ^d	18,54±2,39 ^{c,d}	0,29±0,02 ^c
230	8	44,76±3,16 ^d	1,59±0,69 ^b	12,2±0,62 ^d	23,25±3,37 ^{c,d}	0,21±0,04 ^c
Ileum von mit Antibiotika behandelten Ratten						
2,24	3	68,23±3,13	4,56±0,43 ⁱ	3,92±0,44	11,09±1,23	0,41±0,06

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Radioaktivitätsmenge in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität.

b-g: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

h: Signifikant verschieden von den Werten, die nach Perfusion mit Jejunumsegmenten und mit 0,319 nMol/ml bei Ileumsegmenten erhalten wurden ($p < 0,01$).

i: Signifikant verschieden von den Werten, die nach Perfusion von Jejunum- bzw. Ileumsegmenten mit 3,41 bzw. 2,48 nMol/ml erhalten wurden ($p < 0,01$).

Tabelle 10 Prozentualer Anteil der Metaboliten an der Gesamt-radioaktivität nach Perfusion mit 14-C-NDBA^a

Konzentration (nMol/ml)	n	Perfusat	Resorbat	Darm
Jejunum				
0,011	4	72,38±4,30 ^b	88,08±3,31 ^{b^e}	68,70±3,03 ^{b^c}
0,319	5	56,37±3,25 ^{b^c}	94,72±0,74 ^{b^c}	73,20±1,22 ^b
0,980	6	40,13±4,89 ^{c^d}	97,19±0,59 ^{c^d}	69,68±1,02 ^{b^c}
3,41	8	33,18±2,78 ^d	97,48±0,34 ^d	60,95±2,39 ^c
12,8	5	28,06±3,18 ^{d^e}	93,96±1,33 ^{b^c}	62,99±3,04 ^{b^c}
57,4	6	19,90±1,61 ^e	79,29±2,44 ^e	32,02±2,48 ^d
230	5	13,78±1,82 ^f	32,40±2,30 ^f	7,48±0,51 ^e
730	6	10,96±0,50 ^f	28,91±2,69 ^f	4,95±0,49 ^f

Jejunum von mit Antibiotika behandelten Ratten

2,24	5	65,35±2,08 ^g	94,98±0,45	70,39±4,24
------	---	-------------------------	------------	------------

Ileum

0,319	6	58,68±2,65 ^b	90,88±0,57 ^b	58,40±1,95 ^b
0,791	6	55,07±2,33 ^b	94,07±0,76 ^c	49,69±2,20 ^b
2,48	6	49,28±2,35 ^b	92,99±2,72 ^{b^c}	57,30±4,21 ^b
11,7	5	20,98±1,90 ^c	56,18±2,04 ^d	10,32±1,08 ^c
57,4	6	10,02±0,97 ^d	26,92±2,04 ^e	6,54±0,79 ^d
230	8	8,14±0,73 ^d	19,84±4,13 ^e	2,40±0,22 ^e

Ileum von mit Antibiotika behandelten Ratten

2,24	3	66,24±4,24 ^g	88,34±2,94 ^g	36,31±4,01 ^g
------	---	-------------------------	-------------------------	-------------------------

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s$)

a: Auf Metabolite entfallende Radioaktivitätsmenge in Prozent der am Versuchsende in der Fraktion enthaltenen Gesamtradioaktivität.

b-f: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

g: Signifikant verschieden von den Werten, die nach Perfusion von Jejunum- bzw. Ileumsegmenten mit 3,41 bzw. 2,48 nMol/ml erhalten wurden ($p < 0,05$).

Tabelle 11 Summe der vom Darm gebildeten Metaboliten nach Perfusion mit 14-C-NDBA^a

Konzentration (nMol/ml)	n	Perfusat	Resorbat	Darm	Waschflasche CO ₂	Gesamt ^b
Jejunum						
0,011	4	49,68±2,12 ^c	17,34±3,12 ^c	9,56±1,27 ^c	1,97±0,27 ^{c,d}	78,54±3,06 ^c
0,319	5	34,48±0,66 ^d	12,59±1,75 ^c	3,64±0,27 ^d	1,69±0,22 ^d	52,40±1,63 ^d
0,980	6	27,94±3,45 ^{d,e}	9,72±0,78 ^c	2,08±0,08 ^e	2,56±0,46 ^{c,d}	42,30±3,87 ^{d,e}
3,41	8	19,61±1,30 ^{e,f}	8,85±0,61 ^d	1,70±0,19 ^e	1,92±0,19 ^d	32,08±2,02 ^e
12,8	5	15,75±2,17 ^f	8,94±0,88 ^{c,d}	1,75±0,06 ^{e,f}	3,00±0,28 ^c	29,45±2,29 ^e
57,4	6	8,99±0,66 ^g	3,67±0,40 ^e	1,10±0,05 ^f	5,16±0,24 ^e	18,93±0,71 ^f
230	5	6,15±0,14 ^h	0,77±0,14 ^f	0,69±0,03 ^g	3,12±0,49 ^{c,d}	10,72±0,73 ^g
730	6	5,03±0,20 ^h	0,73±0,04 ^f	0,47±0,08 ^g	0,72±0,06 ^f	6,94±0,29 ^h

Jejunum von mit Antibiotika behandelten Ratten

2,24	5	40,10±2,54 ⁱ	11,47±1,63 ⁱ	3,06±0,42 ⁱ	1,03±0,11 ⁱ	55,65±1,69 ⁱ
------	---	-------------------------	-------------------------	------------------------	------------------------	-------------------------

Ileum

0,319	6	44,69±1,85 ^c	2,63±0,81 ^{c,d}	3,55±0,33 ^c	0,58±0,06 ^c	51,44±2,16 ^c
0,791	6	34,95±2,19 ^d	1,71±0,27 ^{c,d}	1,80±0,08 ^{d,e}	0,43±0,11 ^c	38,89±1,97 ^d
2,48	6	31,61±1,08 ^d	2,22±0,20 ^c	2,10±0,06 ^d	0,39±0,06 ^{c,d}	36,31±0,98 ^d
11,7	5	12,51±0,82 ^e	1,04±0,12 ^d	1,24±0,17 ^{e,f}	0,26±0,09 ^{c,d}	15,05±0,97 ^e
57,4	6	5,07±0,65 ^f	0,28±0,03 ^e	0,83±0,07 ^f	0,29±0,02 ^d	6,46±0,67 ^f
230	8	3,54±0,26 ^f	0,17±0,06 ^e	0,29±0,03 ^g	0,21±0,04 ^d	4,21±0,26 ^g

Ileum von mit Antibiotika behandelten Ratten

2,24	3	44,93±0,77 ⁱ	4,05±0,53 ⁱ	1,46±0,31 ⁱ	0,41±0,06	50,95±1,15 ⁱ
------	---	-------------------------	------------------------	------------------------	-----------	-------------------------

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

- a: Auf Metabolite entfallende Radioaktivitätsmenge am Versuchsende in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität
b: Summe aus Perfusat, Resorbat, Darm und CO₂-absorbierende Waschflasche
c-h: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).
i: Signifikant verschieden von den Werten, die nach Perfusion von Jejunum- bzw. Ileumsegmenten mit 3,41 bzw. 2,48 nMol/ml erhalten wurden ($p < 0,05$).

Tabelle 12: Transfer der Radioaktivität und der auf Originalsubstanz und Metabolite entfallenden Anteile nach Perfusion mit 14-C-NDBA

Konzentration (nMol/ml)	n	S/M ^a		
		Gesamt-R.A.	Originalsubstanz	Metabolite
Jejunum				
0,011	4	6,52±0,74 ^b	1,56±0,51 ^{bef}	4,29±0,81 ^{bd}
0,319	5	5,02±0,45 ^{bd}	0,69±0,18 ^{bedf}	9,00±0,73 ^c
0,980	6	3,16±0,15 ^c	0,15±0,04 ^{cd}	8,01±1,41 ^{bc}
3,41	8	3,67±0,29 ^{cd}	0,14±0,02 ^d	11,44±1,61 ^{bc}
12,8	5	3,08±0,39 ^{cde}	0,19±0,02 ^{bd}	10,41±1,27 ^c
57,4	6	1,89±0,12 ^{ef}	0,48±0,05 ^e	7,93±1,07 ^{bc}
230	5	1,45±0,21 ^{fg}	1,03±0,13 ^f	3,13±0,31 ^d
730	6	1,01±0,07 ^g	0,75±0,07 ^{ef}	2,57±0,48 ^d
Jejunum von mit Antibiotika behandelten Ratten				
2,24	5	3,50±0,55	0,15±0,01	5,09±0,72 ^h
Ileum				
0,319	6	3,02±0,35 ^b	0,60±0,03 ^b	4,23±0,25 ^b
0,791	6	1,26±0,10 ^{cd}	0,36±0,05 ^c	4,69±0,47 ^b
2,48	5	2,23±0,10 ^b	0,25±0,09 ^c	3,92±0,43 ^b
11,7	5	1,79±0,15 ^{bc}	0,97±0,07 ^d	4,77±0,48 ^b
57,4	6	1,30±0,12 ^{cd}	1,10±0,07 ^d	3,71±0,36 ^b
230	8	1,27±0,09 ^d	0,86±0,12 ^{bd}	2,13±0,31 ^c
Ileum von mit Antibiotika behandelten Ratten				
2,24	3	2,11±0,15	0,34±0,06	2,72±0,30

Jejunum- und Ileumsegmente von durchschnittlich 10 cm Länge wurden 2 Stunden im Glasperfusator nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (10) perfundiert. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Verhältnis der Konzentration im Resorbat (S = Serosaseite) und im Perfusat (M = Mucosaseite)

b-g: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

h: Signifikant verschieden von dem Wert, der nach Perfusion von Jejunumsegmenten mit 3,41 nMol/ml erhalten wurde ($p < 0,05$).

7.4.2. Entstehung und Verteilung von Stoffwechselprodukten

Auch beim NDPA zeigte sich wie beim NDPA bei der HPLC-Analyse von Resorbat und Perfusat, daß der Darm in der Lage war dieses Nitrosamin zu hydrophilen Metaboliten zu verstoffwechseln. In den Abbildungen 7 und 8 sind zwei typische HPLC-Chromatogramme eines NDPA-Standards und einer Resorbatprobe von einem mit 3,41 nMol/ml perfundierten Jejunumsegment wiedergegeben und zwar links die Radioaktivitätschromatogramme und rechts davon, jeweils von den gleichen Proben, die im UV-Detektor gemessenen Chromatogramme. Der Peak der Originalsubstanz erschien bei allen vier Chromatogrammen bei ca. 5 Minuten. Beim Resorbat waren zusätzlich im Radioaktivitätschromatogramm zwei deutliche Peaks bei ca. 2-3 Minuten, die von Metaboliten herrühren, zu erkennen. Sie waren deutlich größer als der Peak der Originalsubstanz, obwohl ca. 90% der Metaboliten von der Vorsäule mit Wasser wieder heruntergewaschen wurden. Im UV-Detektor war beim Resorbat der NDPA-Peak bei 5 Minuten nur noch angedeutet. Bei den vorangehenden Peaks war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich.

Sowohl im Perfusat als auch, allerdings mit einer gewissen Verzögerung, im Resorbat, nahm der Anteil an Metaboliten mit steigender NDPA-Konzentration deutlich ab (Abb.9; Tab.10). Er war im Resorbat wiederum ca. 2-3 mal so hoch wie im Perfusat. Im Darmgewebe entfielen beim Jejunum bei den Konzentrationen zwischen 0,3 und 57 nMol/ml höhere Anteile der Radioaktivität auf hydrophile Metaboliten als im Perfusat, während bei der niedrigsten und den beiden höchsten Konzentrationen geringere Anteile als im Perfusat gefunden wurden. Beim Ileum lagen die Werte meist etwas niedriger als im Perfusat.

Verglich man die Konzentrationen von NDPA und die seiner Metaboliten im Resorbat und Perfusat, dann ergab sich beim Jejunum, abgesehen von der niedrigsten Konzentration, eine sehr hohe Anreicherung der Metabolite um das 8-11 fache im Resorbat, die erst bei den beiden höchsten Konzentrationen signifikant abnahm, während NDPA selbst nicht angereichert wurde. Auch beim Ileum wurden nur die Metaboliten und nicht NDPA selbst im Resorbat akkumuliert und zwar um das 4-5 fache, außer

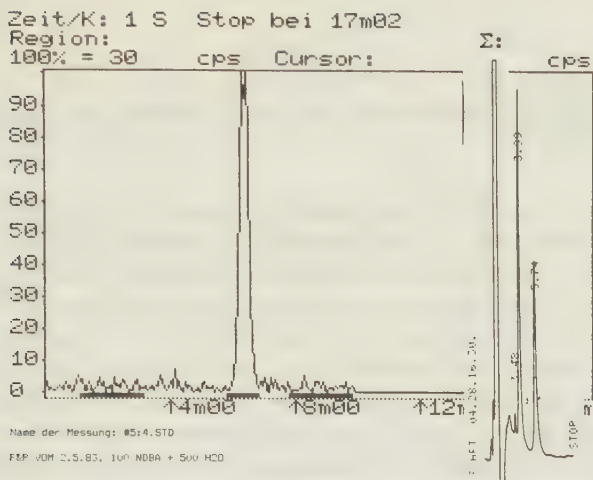


Abb. 7: HPLC-Chromatogramm einer Tyrodelösung mit 3,41 nMol 14-C-NDDBA/ml. Es wurden 100 µl Tyrodelösung auf eine Vorsäule gegeben und mit 500 µl Aqua tridest. nachgespült. Am rechten Bildrand des Radioaktivitätschromatogramm ist das bei 234 nm mit dem UV-Detektor erhaltene Chromatogramm zu sehen.

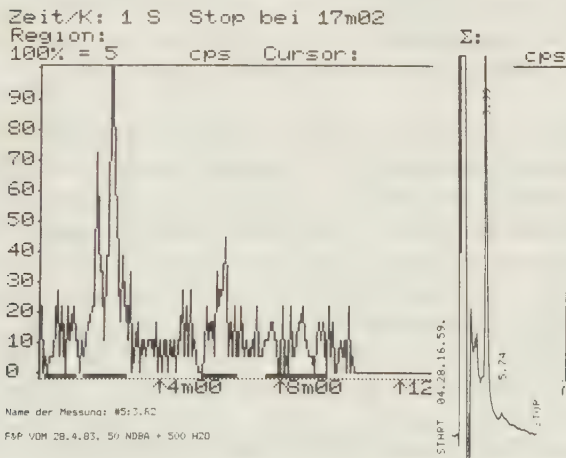


Abb. 8: HPLC-Chromatogramm einer Resorbatprobe eines zwei Stunden mit 3,41 nMol 14-C-NDDBA/ml perfundierten Jejunumsegmentes. Es wurden 50 µl Resorbatflüssigkeit auf eine Vorsäule gegeben und mit 500 µl Aqua tridest. nachgespült. Am rechten Bildrand des Radioaktivitätschromatogramm ist das bei 234 nm mit dem UV-Detektor erhaltene Chromatogramm zu sehen.

bei der höchsten Konzentration, bei der die Akkumulation signifikant abnahm.

Auch bei der Betrachtung des Gesamtmetabolismus in Prozent der eingesetzten Menge (Tab.11) kam deutlich die abnehmende Kapazität des Darmes zur Verstoffwechselung von NDBA mit steigenden Konzentrationen zum Ausdruck. Der Anteil der Metaboliten nahm im Perfusat und, wieder mit einer gewissen Verzögerung, im Resorbat ab. Es waren bei der niedrigsten Konzentration im Jejunum ca. 50% der gesamt eingesetzten Radioaktivität in Form von Metaboliten im Perfusat, 17% im Resorbat, 9% im Darm und ca. 2% in der CO_2 -absorbierenden Waschflasche. Dies entsprach einer Gesamtverstoffwechselung von 78%. Letztere nahm bis zur höchsten Konzentration auf 7% ab. Die Werte in Perfusat, Resorbat und Darm verminderten sich im ähnlichen Verhältnis. Beim Ileum entsprach die Abnahme in etwa der des Jejunums, wobei jedoch die Werte im Perfusat (80-90% der Gesamtmetabolite) höher als die entsprechenden im Jejunum (50-70%) waren und die Werte im Resorbat entsprechend niedriger waren. Der Gesamtmetabolismus bewegte sich im Ileum zwischen 52% bei der niedrigsten und 4% bei der höchsten Konzentration. Die Abnahme des Gesamtmetabolismus entsprach im Verhältnis nicht der Zunahme der NDBA-Konzentration, so daß eine Sättigung der Stoffwechselkapazität der Darmsegmente noch nicht erreicht war.

Bei Vergleich der ins Resorbat übergetretenen bzw. der im Darm aufgenommenen Radioaktivitätsmengen, in Prozent des Angebots, mit den auf Metabolite entfallenden Anteilen, zeigte sich in beiden Fällen eine deutliche Abnahme des Metabolitenanteils mit zunehmender Konzentration sowohl im Jejunum, als auch im Ileum (Abb.9 und 10). Im Resorbat war der Abfall der Gesamtradioaktivität bei den drei höchsten Konzentrationen geringer als die Abnahme der Metaboliten. Dies war beim Ileum noch ausgeprägter als beim Jejunum. Im Darm nahm bei den Konzentrationen über 10 nMol NDBA/ml die Gesamtradioaktivität in Jejunum- und Ileumsegmenten wieder deutlich zu und wich somit nach parallelem Verlauf zur Metabolitenkurve bei den niedrigen Konzentrationen eindeutig von dieser ab.

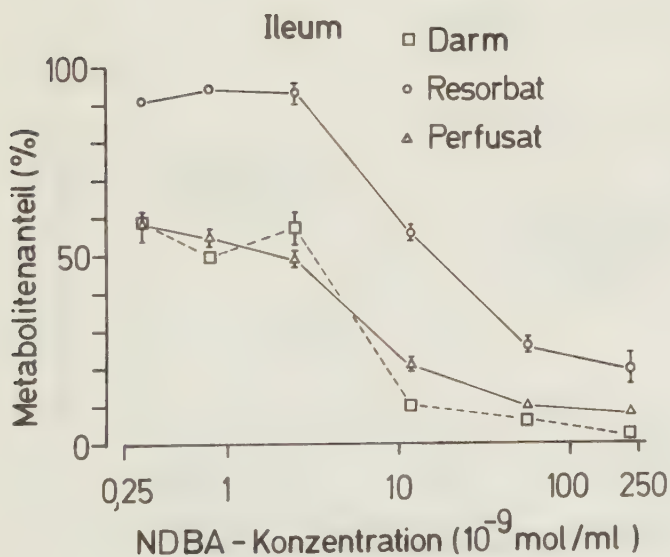
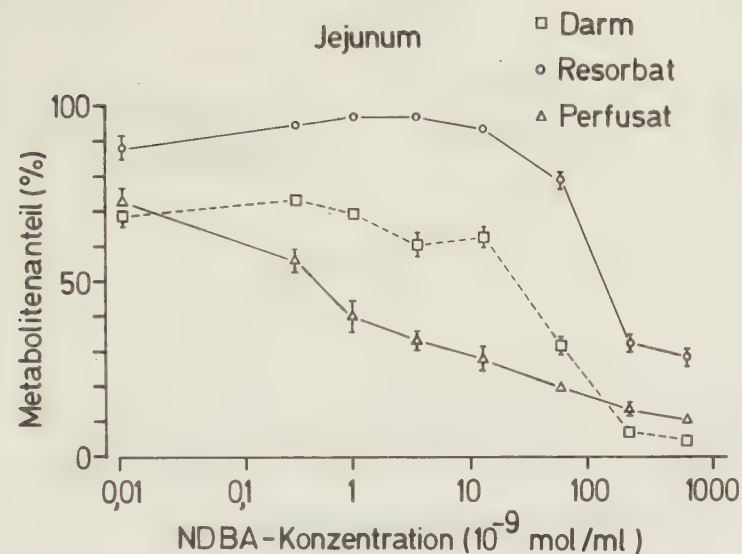


Abb. 9: Metabolisierungsrate von ^{14}C -NDBA in Jejunum- und Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 4-8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_x$).

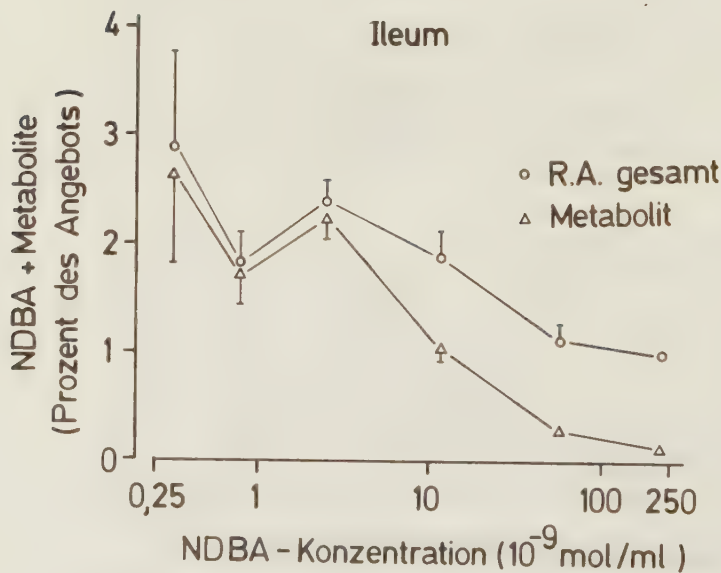
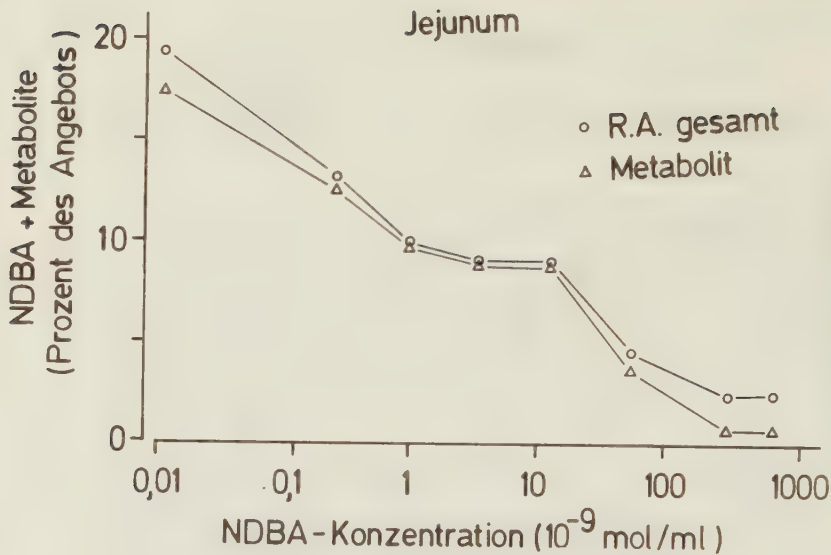


Abb.10: Transfer von ^{14}C -NDBA und Metaboliten in Prozent des Angebots in Jejunum- und Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 4-8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_x$).

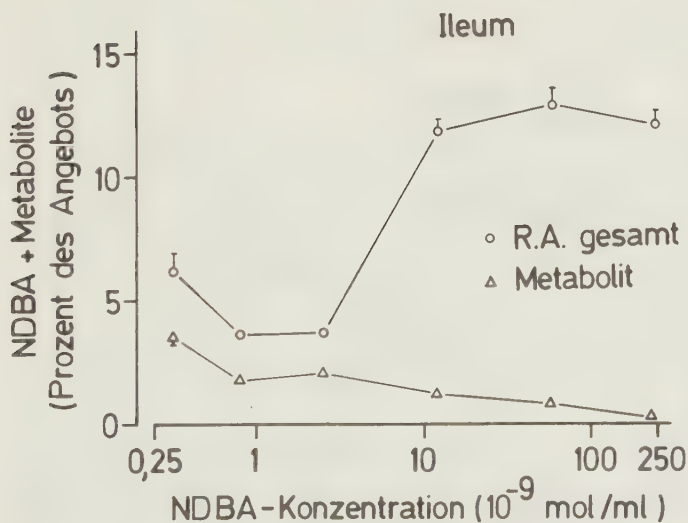
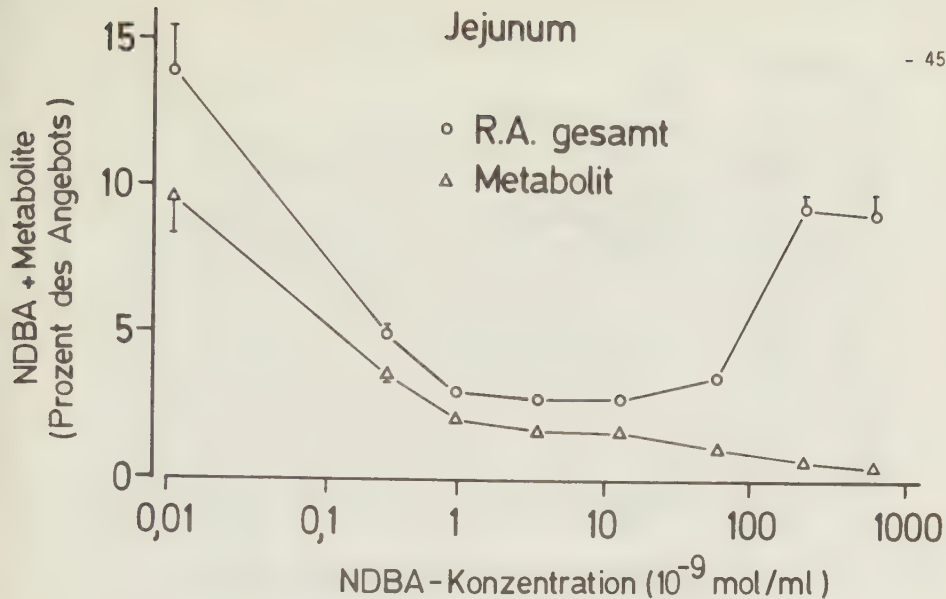


Abb.11: Gehalt von ^{14}C -NDBA und Metaboliten in Prozent des Angebots in Gewebe von Jejunum- und Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 4-8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

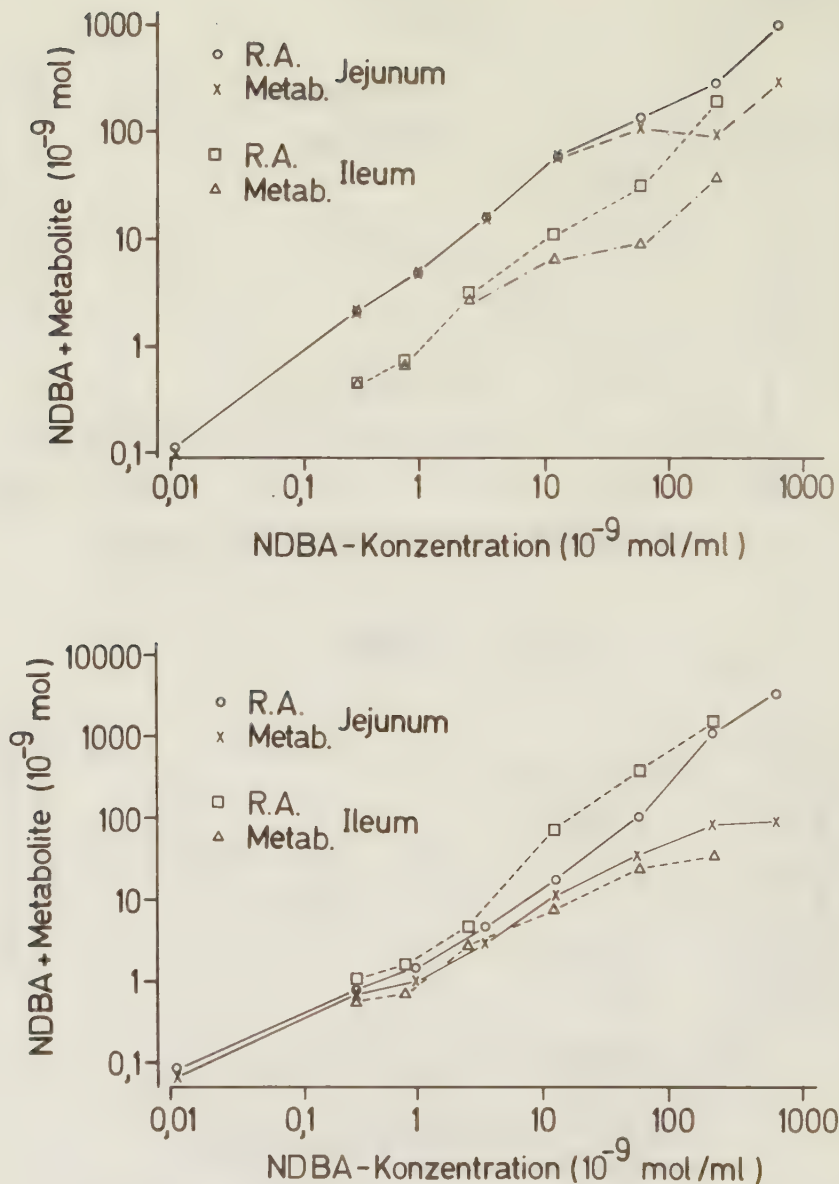


Abb. 12: Gesamttransfer in das Resorbat (oben) und Gesamtgehalt im Darmgewebe (unten) von ^{14}C -NDBA und Metaboliten bei Jejunum- und Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten von 4-8 Einzelversuchen.

7.4.3. Kovalente Bindung von Stoffwechselprodukten im Darmgewebe

Für die Bestimmung der kovalenten Bindung wurden die Homogenate von Jejunumsegmenten herangezogen, die zwei Stunden mit 57,4 nMol NDBA/ml perfundiert worden waren. Der Metabolitenanteil betrug bei dieser Konzentration ca. 32% (Tab.10). Nach Proteinfällung und Extraktion mit Trichloressigsäure und lipophilen Lösungsmitteln wurden in den Pellets nur noch 1,93±0,19% der Radioaktivität wiedergefunden. Das ergab ungefähr 6% des Metabolitengehalts im Darm und 0,35% der vom Darm insgesamt gebildeten Metaboliten und 0,066% der applizierten Dosis.

7.4.4. Ergebnisse mit antibiotisch vorbehandelten Ratten

In den Perfusatproben wurden nur bei 2 von 7 Jejunumsegmenten geringe Antibiotikarestmengen nachgewiesen. Bezogen auf Gentamicinsulfat als Vergleichssubstanz betrugen sie weniger als 1µg/ml (0,25-0,6µg/ml). Die Gesamtkeimzahl in 0,5ml war äußerst gering (0-35 Keime) und unterschied sich nicht von der Grundkontamination in der Tyrodelösung (21 Keime).

Die Verteilung der Gesamtradioaktivität (Tab.9) unterschied sich teilweise von den Ergebnissen mit unbehandelten Ratten. Bei vergleichbaren Konzentrationen, 2,24 nMol/ml bei antibiotisch behandelten Ratten gegenüber 3,41 nMol/ml bei Jejunum und 2,48 nMol/ml bei Ileum, fanden sich beim Jejunum signifikant höhere Werte im Darmgewebe, aber signifikant niedrigere Werte in der CO₂-absorbierenden Waschflasche, beim Ileum nur signifikant höhere Werte im Resorbat. Hinsichtlich der Transportleistung fand sich dagegen nur beim Jejunum eine signifikant niedrigere Anreicherung der Metabolite im Resorbat (Tab.12). Der Metabolitenanteil (Tab.10) war bei beiden Darmabschnitten im Perfusat signifikant erhöht, im Resorbat gleich und im Darm nur beim Ileum signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Daraus resultiert ein erhöhter Gesamtmetabolismus (Tab.11), der sich in erster Linie aus den erhöhten Metabolitengehalten im Perfusat herleitet.

IV. Diskussion

Die Untersuchungen zum Stoffwechsel von symmetrischen Dialkyl-nitrosaminen sollen im folgenden unter zwei Aspekten betrachtet und diskutiert werden.

1. Vergleich der Resorption und der Stoffwechselkapazität von Jejunum- und Ileumsegmenten.
2. Welche Rückschlüsse können aufgrund der Untersuchungen *in vitro* auf die Abhängigkeit der metabolischen Umwandlung im Darm von der Polarität der angebotenen Substrate gezogen werden?

1. Vergleich der Resorption und der Stoffwechselkapazität von Jejunum- und Ileumsegmenten.

1.1. Methodisch-kritische Vorbemerkungen

Isoliert durchströmte, nicht durchblutete Darmsegmente nach der Methode von Fisher und Parsons (10), modifiziert durch Rummel und Stupp (25), zeichnen sich dadurch aus, daß sie, begünstigt durch den Durchströmungsdruck auf der Mucosaseite von ca 25 cm H₂O, eine leicht meßbare Resorptionsleistung für Flüssigkeit zeigen. Jejunumsegmente resorbieren in der Stunde ca. 1 ml/10 cm Darmlänge, Ileumsegmente nur etwa das Drittel bis die Hälfte. Diese Darmpräparationen eignen sich besonders gut für orientierende und vergleichende Untersuchungen der metabolischen Umwandlung eines Stoffes während des Durchtritts, weil die innerhalb der Versuchszeit von zwei Stunden gewonnenen Resorbatmengen die Analytik erleichtern. Aufgrund des fehlenden Blutflusses ist jedoch bei der Übertragung der Ergebnisse auf in vivo-Verhältnisse Vorsicht geboten. Nach Coulson und Herbert (27) ist die Reaktionskinetik im lebenden Tier nicht wie in vitro nur von den Parametern einer Enzymkinetik nach Michaelis-Menten, der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) und der Michaeliskonstante (K_m), abhängig, sondern auch von der Durchblutungsgeschwindigkeit. Die Darmsegmente sind durch die langsame Wasserresorption in vitro der zu untersuchenden

Substanz unter Umständen sehr viel länger ausgesetzt als bei einer raschen Resorption per diffusionem in vivo. Der rasche Durchtritt der Originalsubstanz durch die Darmwand könnte in vivo die Verstoffwechselungsrate reduzieren. Deshalb sollten nach den orientierenden Ergebnissen in vitro die aufwendigeren Untersuchungen in vivo durchgeführt werden.

1.2. Resorption und Metabolismus von NDEA

Nach Perfusion von Darmsegmenten mit NDEA fand man gleiche Konzentrationen der Muttersubstanz in Perfusat und Resorbat, die sich in dem von 1 nicht verschiedenen S/M-Quotienten ausdrückten (Tab.4). Auch im Darm waren, bezogen auf das Feuchtgewicht, die gleichen Konzentrationen gegeben wie in Resorbat und Perfusat. Das wasserlösliche NDEA ist offensichtlich in der Lage, biologische Membranen frei zu passieren. Zu den gleichen Ergebnissen kamen Brittebo et al.(28) bei ihren autoradiografischen Untersuchungen mit ^{14}C -NDEA bei Mäusen. Pegg und Perry (29) fanden nach Applikation von ^{14}C -NDEA in eine abgebundene Jejunumschlinge bei Ratten "ex vivo" eine sehr rasche und vollständige Resorption. Gemessen an der Abnahme der Radioaktivität im Darminhalt ergab sich eine Halbwertszeit von ca. 3 Minuten. Die rasche Resorption stand im Einklang mit dem schnellen Einbau von Radioaktivität in die DNS der Leber. Eine Resorption von nur 1-5% bei unseren Untersuchungen in vitro (Tab.4) muß also nicht bedeuten, daß in vivo die gleiche Substanz nicht rasch und vollständig resorbiert werden kann. Die beobachteten Unterschiede zwischen Jejunum- und Ileumsegmenten erklären sich deshalb aus der geringeren Wasserresorption beim Ileum (weniger NDEA im Resorbat) und dem höheren Feuchtgewicht beim Ileum (mehr NDEA im Darmgewebe).

Bei der niedrigsten Konzentration, 0,126 nMol/ml, die nur am Jejunum getestet wurde, fanden wir eine leichte Erhöhung der Radioaktivität in der CO_2 -absorbierenden Waschflasche. Dies mag ein Hinweis auf einen Stoffwechsel durch den Darm bei sehr niedrigen Konzentrationen sein. Das beim enzymatischen Abbau von NDEA als Endprodukt entstehende CO_2 wird häufig als Maßstab für die Stoffwechselaktivität von Geweben

gegenüber NDEA herangezogen. Brittebo et al. (28) fanden bei Mäusen in Darmhomogenaten nach Applikation von $2,5 \mu\text{Mol } ^{14}\text{C-NDEA}$ keine gegenüber den Kontrollwerten erhöhte CO_2 -Produktion. In Geweben von sogenannten Zielorganen, das sind Organe bei denen NDEA krebsartige Veränderungen erzeugt (z.B. Nasenschleimhaut, Leber, Ösophagus, Lunge etc.), war jedoch eine signifikante CO_2 -Bildung nachweisbar. In Zellkulturen von menschlicher Colonmukosa war dagegen eine geringfügige CO_2 -Produktion nach Applikation von $100 \mu\text{Mol } ^{14}\text{C-NDEA}$ nachgewiesen worden (30). Eine geringe CO_2 -Bildung wurde schließlich auch im Dünndarm von Ratten in vitro nachgewiesen. Gewebsschnitte vom Dünndarm produzierten bei einer Dosis von ca $0,35 \text{ mMol } ^{14}\text{C-NDEA}$ in 90 min. $0,14\% \text{ CO}_2$, das entsprach 7% der mit Leberschnitten erhaltenen Werte (31).

1.3. Resorption und Metabolismus von NDPA

Bei der Betrachtung des Transfers der Gesamtradioaktivität nach Perfusion mit NDPA fiel als erstes bei niedrigen Konzentrationen eine Anreicherung im Resorbat auf (Tab.8), die beim Jejunum deutlicher, beim Ileum nur schwach ausgeprägt war. Dies wäre für eine relativ lipophile Substanz ein ungewöhnliches Ergebnis, wenn nicht beim Durchtritt eine metabolische Veränderung stattgefunden hätte. Tatsächlich zeigte sich, daß der Darm bis zu 60% des resorbierten NDPA zu wesentlich hydrophileren Stoffwechselprodukten umgewandelt hatte (Abb.3, Tab.6). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Komp und Forth (11) mit dem Röntgenkontrastmittel Iopodat. Auch hier fand sich nach Perfusion von Jejunumsegmenten nach der Methode von Fisher und Parsons (10) eine Anreicherung der Radioaktivität um das 2-3 fache im Resorbat. Allerdings war der Anteil an Metaboliten im Perfusat und im Darmgewebe im vergleichbaren Konzentrationsbereich zwischen 1 und 100 nMol/ml bei Iopodat wesentlich geringer als in den vorliegenden Untersuchungen mit NDPA. Während bei Iopodat im Darmgewebe bzw. Perfusat nur $1/10$ bis $1/20$ des prozentualen Metabolitengehalts im Resorbat gefunden wurden, waren es beim NDPA etwa die Hälfte bis ein Drittel. Dies könnte mit der Natur der gebildeten Metaboliten zusammenhängen, d.h. im Falle des NDPA könnten anstelle von Glucuroniden andere Metaboliten gebildet

worden sein. Die zur Beantwortung dieser Frage notwendige Charakterisierung der NDPA-Metaboliten steht noch aus.

Verglich man nach Perfusion von NDPA die Metabolisierungsraten von Jejunum- und Ileumsegmenten, dann zeigte sich eindeutig eine schwächere metabolische Kapazität für das Ileum (Tab.6 und 7, Abb. 3-5 und 13). Dieser Unterschied ist nur zum Teil durch die unterschiedliche Oberfläche der Mukosa erklärbar, denn pro Längeneinheit hat das Jejunum der Ratte nur eine ca 1,4 fach größere Oberfläche als das Ileum (32). Bei Betrachtung des Gesamtstoffwechsels (Tab.7) ergaben sich jedoch, abgesehen von der höchsten Konzentration, erheblich größere Unterschiede zwischen Jejunum und Ileum. Außerdem fiel auf, daß beim Ileum vergleichsweise mehr Metaboliten im Perfusat verblieben als beim Jejunum (Tab.7). Dies erklärte sich nur zum Teil aus der geringeren Wasserresorption des Ileums, denn auch die Konzentrationsverhältnisse der Metaboliten in Resorbat und Perfusat (Tab.8) waren bei Jejunum und Ileum unterschiedlich. Jejunumsegmente reicherten die Metaboliten stärker im Resorbat an als Ileumsegmente.

Stoffwechseluntersuchungen mit NDPA am Darm sind uns aus der Literatur nicht bekannt. Nach oraler Gabe von ca 250 mg NDPA/kg an männliche Ratten fanden Suzuki und Okada (33) im Urin als Hauptmetabolit das omega-Oxidationsprodukt N-Nitroso-propyl-(2-carboxyethyl)amin, daneben das omega-1-Oxidationsprodukt N-Nitroso-propyl-(2-hydroxypropyl)amin sowie dessen Glucuronid. Leung und Archer (19) wiesen nach intra-peritonealer Applikation von 77 mg NDPA/kg als weiteren Metabolit N-Nitroso-propyl-(2-oxopropyl)amin nach. In beiden Untersuchungen wurden jedoch nur ca 5% der Dosis in Form dieser Metaboliten wiedergefunden. In Rattenlebermikrosomen fand Archer (34) nach Inkubation mit NDPA n- und iso-Propanol als Metaboliten.

Durch weitere Verstoffwechselung der gebildeten Alkohole war die Entstehung von CO_2 als Endprodukt zu erwarten. Tatsächlich fanden wir in unseren Untersuchungen beim Jejunum und zum Teil auch beim Ileum signifikant erhöhte Radioaktivitätsmengen in der CO_2 -absorbierenden Waschflasche (Tab.5). In der Gesamtbilanz der gebildeten Metaboliten

(Tab.7) trug sie in jedem Fall mehr bei als das Resorbat und zwar beim Jejunum ca 1/5 beim Ileum dagegen durchschnittlich nur 1/20. Dies könnte bedeuten, daß das Ileum bei der weiteren Verstoffwechselung von primär gebildeten Metaboliten eine noch viel schwächere Kapazität besitzt. Zur weiteren Abklärung dieser Zusammenhänge muß jedoch zunächst die Identifizierung und Quantifizierung der gebildeten Metaboliten abgewartet werden.

Neben der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung sollte bei der Propanol freisetzenden alpha-Hydroxylierung auch eine kovalente Bindung von reaktiven Metaboliten an Eiweißstrukturen nachzuweisen sein. Dieser Frage wurde bei Jejunumsegmenten nach Perfusion mit 6,48 nMol NDPA/ml nachgegangen. Von den im Darmgewebe nachgewiesenen Metaboliten waren 20% nicht extrahierbar, so daß von einer kovalenten Bindung ausgegangen werden kann. Im Vergleich zur $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung - die Radioaktivität kann aufgrund der spezifischen Markierung nur vom alpha-C-Atom herrühren - wurde aber sehr viel weniger Prozent der applizierten Dosis im Darmgewebe gebunden und zwar 0,1% gegenüber 4,8%.

Schließlich muß noch auf eine mögliche Fehlerquelle bei der Gesamtbilanz der Metaboliten hingewiesen werden. Wir gingen stets davon aus, daß in der ersten Butanol enthaltenden Waschflasche nur unverändertes Nitrosamin wiedergefunden wird. Es ist aber möglich, daß evtl. gebildetes Propanol und/oder Isopropanol ebenfalls mit dem Wasserdampf während der Versuchszeit in diese Waschflasche gelangte.

1.4. Resorption und Metabolismus von NDPA

Nach Perfusion von Darmsegmenten mit NDPA konnte eine starke Anreicherung der Radioaktivität im Resorbat beobachtet werden, die bei Jejunumsegmenten stärker ausgeprägt war als bei Ileumsegmenten (Tab.12). Wiederum konnte dieses ungewöhnliche Phänomen (Vergleiche die Diskussion in 8.1.3.) durch eine Verstoffwechselung des NDPA durch den Darm erklärt werden.

Das Ileum besaß auch gegenüber NDBA eine schwächere metabolische Kapazität als das Jejunum (Tab.10 und 11, Abb.9-11,13). Dies machte sich aber erst bei den höheren Konzentrationen bemerkbar. Bei den drei niedrigsten Konzentrationen wurde beim Ileum der geringere Metabolitengehalt im Resorbat durch erhöhte Gehalte im Perfusat ausgeglichen. Parallel dazu fanden sich wieder höhere Anreicherungen der Metaboliten beim Jejunum, d.h. höhere Konzentrationen von Metaboliten im Resorbat verglichen mit Perfusat (Tab.12). Ebenso wie beim NDPA reichte die etwa um den Faktor 3 geringere Wasserresorption beim Ileum gegenüber dem Jejunum nicht für die Erklärung der beobachteten Unterschiede aus.

Aufgrund der besonderen organotropen Wirkung des NDBA, das bei niedriger Dosierung fast ausschließlich Blasen Tumoren erzeugt, wurden eine Vielzahl von Untersuchungen über dessen Stoffwechsel durchgeführt. Trotzdem findet sich keine Angabe über eine Verstoffwechselung durch den Darm. Brittebo und Tjälve (35) fanden nach i.v. Injektion von 5mg ^{14}C -NDBA/kg an junge Ratten bei autoradiographischen Untersuchungen zwar eine gewisse Anreicherung von Radioaktivität in den gastrointestinalen Schleimhäuten, interpretierten dies jedoch nicht als Ausdruck einer metabolischen Kapazität. Eine Übersicht der bisher identifizierten Metabolite findet sich bei Okada und Ishidate (20). Das Hauptausscheidungsprodukt im Rattenurin ist nach oraler Gabe N-Nitroso-butyl-(3-carboxybutyl)amin = BCPN, das nach oraler Gabe ca 10%, nach subkutaner Gabe aber 25% der Dosis ausmacht. Dieser Metabolit wird für die blasenkrebs erzeugende Wirkung verantwortlich gemacht. Auf andere Metaboliten, die durch weitere Oxidation des BCPN bzw. omega-1- oder omega-2-Oxidation von NDBA entstehen, entfallen nur noch wenige Prozent, so daß auch hier eine erhebliche Lücke zwischen applizierter Dosis und wiedergefundenen Metaboliten im Urin bestehen bleibt.

Mit Rattenlebermikrosomen bekommt man als Hauptmetaboliten Butyraldehyd und Nitrit (36). Nach i.v. Gabe von 5 mg ^{14}C -NDBA/kg schieden junge Ratten 5-6% der Dosis als $^{14}\text{CO}_2$ aus (35). CO_2 war also auch hier als metabolisches Endprodukt zu erwarten. Nach Perfusion von Jejunum-

und Ileumsegmenten fanden wir wieder erhöhte Radioaktivitätsmengen in der CO_2 -absorbierenden Waschflasche. Sie trägt jedoch bei den 5 bzw. 4 niedrigsten Konzentrationen bei Jejunum und Ileum wesentlich weniger zur Gesamtbilanz bei als das Resorbat, und zwar $1/10 - 1/50$ beim Jejunum und $1/100$ beim Ileum.

Neben der CO_2 -Bildung wurde bei einer Versuchsgruppe auch die kovalente Bindung am Darmgewebe geprüft. Nach Perfusion mit $57,4 \text{ nMol/ml}$ war nur 6% der auf Metabolite entfallenden Radioaktivität nicht extrahierbar. Das ergab nur 0,066% der Gesamtdosis gegenüber ca 5% in der CO_2 -absorbierenden Waschflasche.

Der Gehalt an Gesamtradioaktivität im Darmgewebe stieg bei höheren Konzentrationen in beiden Darmsegmenten sprunghaft an, obwohl der Metabolitengehalt (Abb.11) und auch der Gesamtmetabolismus (Abb.13) gleichmäßig abnahm. Dieses Phänomen wurde auch bei anderen lipophilen Substanzen beobachtet (37). Eine Erklärung hierfür sollte in weiteren systematischen Untersuchungen gefunden werden.

Nach Vorbehandlung mit den beiden Antibiotika Gentamicin und Cefoxitin, die beide oral praktisch nicht resorbierbar sind, war keine Erniedrigung der metabolischen Kapazität zu sehen. In Anbetracht der äußerst geringen Keimzahlen im Perfusat konnte durch diesen Versuch eine bakterielle Beteiligung am Stoffwechsel von NDPA in der von uns verwendeten Versuchsanordnung weitgehend ausgeschlossen werden. Es fand sich im Gegenteil eine leichte Erhöhung des Gesamtstoffwechsels und eine Verschiebung innerhalb der Verteilung der auf Metabolite entfallenden Radioaktivität. Ob dies Ausdruck einer Veränderung der Stoffwechselwege ist, es wurde z.B. weniger Radioaktivität in der CO_2 -absorbierenden Waschflasche gefunden, kann erst nach Aufklärung der gebildeten Metaboliten und/oder durch weitere Untersuchungen mit diesen Antibiotika geklärt werden.

Hinsichtlich der möglichen Fehlerquelle bei der Bilanzierung der Metabolite sei auf die Diskussion in 8.1.3. verwiesen. Auch im Falle des NDBA ist nicht auszuschließen, daß Abbauprodukte wie z.B. ¹⁴C-Butanol neben dem NDBA selbst in der "kaltes" Butanol enthaltenden Waschflasche waren.

2. Welche Rückschlüsse können aufgrund der Untersuchungen in vitro auf die Abhängigkeit der metabolischen Umwandlung im Darm von der Polarität der angebotenen Substrate gezogen werden?

Bei den untersuchten Nitrosaminen zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit der Stoffwechselkapazität des Rattendarms in vitro von der Polarität. Während bei NDEA, dem mit Abstand wasserlöslichsten Nitrosamin in der von uns untersuchten Reihe, höchstens bei der niedrigsten Konzentration von ca 0,1 nMol/ml eine geringe Verstoffwechselung zu CO₂ gefunden wurde, war bei den lipophileren NDPA und NDBA ein konzentrationsabhängiger Stoffwechsel gegeben. Der Vergleich zwischen NDPA und NDBA (Abb.13) zeigte, daß das lipophilere NDBA noch wesentlich besser verstoffwechselt werden konnte als das NDPA. Dieser Effekt war bei Ileumsegmenten noch deutlicher ausgeprägt als bei Jejunumsegmenten.

Vergleichende Untersuchungen des Stoffwechsels von symmetrischen Dialkylnitrosaminen in Mäuselebermikrosomen finden sich bei Schrenk et al. (38). Es bestand eine strenge Korrelation zwischen dem Dichlormethan-Wasser-Verteilungskoeffizienten und der metabolischen Nitritbildung. In Rattenlebermikrosomen wurde dagegen NDEA effektiver dealyliert und denitrosiert als NDBA (36; 39).

Bei den vorliegenden Untersuchungen schien es nicht sinnvoll, die Ergebnisse des Gesamtstoffwechsels den üblichen Formeln für Reaktionskinetiken enzymatischer Vorgänge, z.B. der Michaelis-Menten-Kinetik, anzupassen. Hierfür eignet sich das verwendete Versuchsmodell nicht, selbst wenn die einzelnen Reaktionsschritte beim Abbau der Nitrosamine erfaßt werden könnten, denn es überlagern sich hier noch Transport-

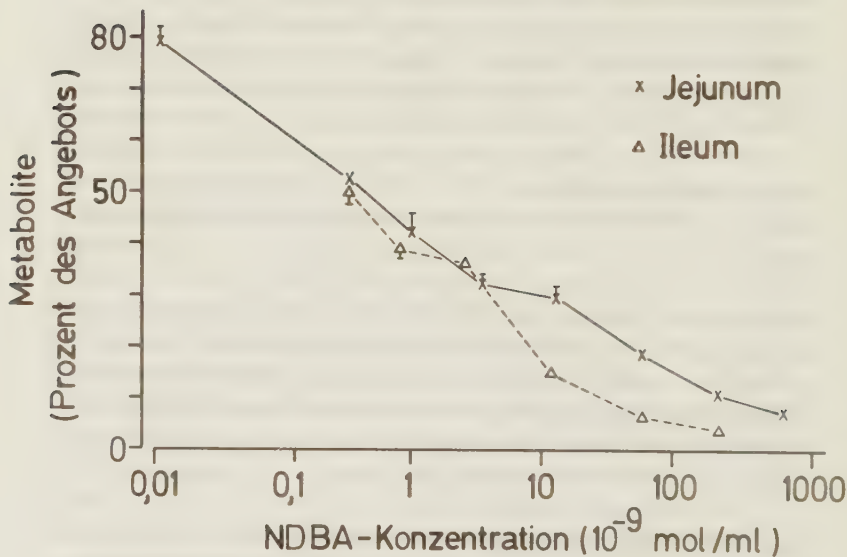
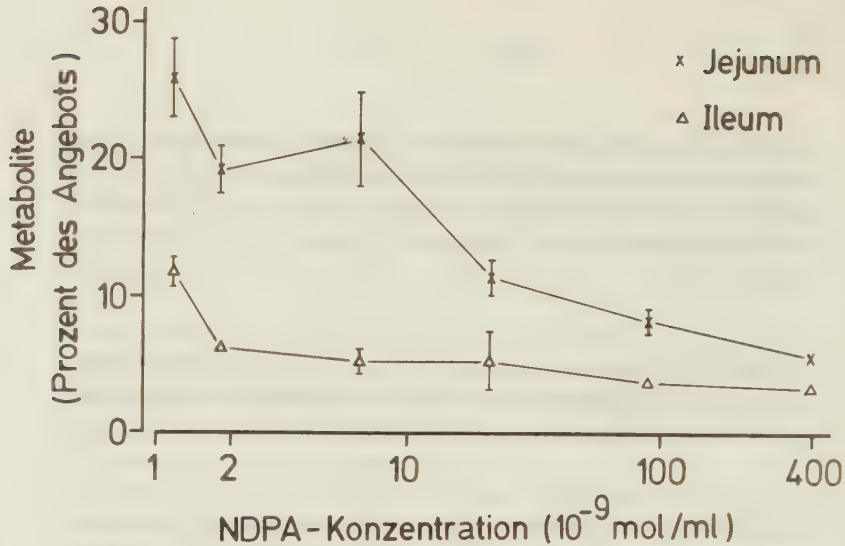


Abb.13. Gesamtmetabolismus von ^{14}C -NDPA und ^{14}C -NDBA in Prozent des Angebots in Jejunum- und Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration, berechnet aus der Summe der auf Metaboliten entfallenden Radioaktivitätsmengen in Perfusat, Resorbat, Darm und CO_2 -absorbierender Waschflasche am Versuchsende. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 4-7, bzw. 4-8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

vorgänge, die von der Mukosazelle aus offensichtlich in beiden Richtungen(serosal und mukosal) stattfinden. Bedenkt man schließlich, daß es das Hauptziel der Untersuchungen war, die Bedeutung des Darms für die Giftung oder Entgiftung der Nitrosamine in vivo aufzuklären, dann gewinnt die letztgenannte Einschränkung noch an Bedeutung.

Neben der Aufklärung der Natur der Stoffwechselprodukte und der Beurteilung ihrer toxikologischen Bedeutung, sollen deshalb die bisherigen Untersuchungen auf ein experimentelles Modell ausgedehnt werden, das eine Messung der intestinalen Resorption und Metabolisierung an der wachen Ratte nach oraler Applikation der Substanz erlaubt.

V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit berichtet über den Transport und Metabolismus von drei symmetrischen Dialkylnitrosaminen an nicht durchbluteten Darmsegmenten von Ratten.

Jejunum- und Ileumsegmente von weiblichen Ratten wurden steigenden Dosen von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Nitrosodiethylamin (NDEA), $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Nitrosodipropylamin (NDPA) und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Nitrosodibutylamin (NDBA) ausgesetzt. Die Untersuchung wurde mit einer Versuchsanordnung modifiziert nach Fisher und Parsons (10) durchgeführt. Die Bestimmung der radioaktiv markierten Nitrosamine und deren Metaboliten erfolgte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatografie. Die Vitalität der untersuchten Darmpräparationen wurde durch Messung des Glucose- und Natriumtransportes überprüft.

Die Ergebnisse können, wie folgt, zusammengefaßt werden.

1. Keines der untersuchten Nitrosamine hatte im gemessenen Konzentrationsbereich zwischen 10^{-11} und 10^{-7} Mol/ml Perfusat einen Einfluß auf die Vitalitätskriterien.
2. Bei der Resorption von NDEA ergab sich keinerlei Konzentrationsabhängigkeit. Im Resorbat, Perfusat und Darmgewebe (bezogen auf Feuchtgewicht) wurden stets die gleichen Konzentrationen gemessen und es war kein Hinweis auf einen Metabolismus zu finden.
3. Beim Übertritt von NDPA wurde im Jejunum eine Anreicherung der Radioaktivität im Resorbat beobachtet. Sie war umgekehrt proportional zur Dosis. Sowohl Jejunum, als auch Ileum waren in der Lage NDPA zu hydrophilen Metaboliten abzubauen. Mit steigenden Konzentrationen nahm die Stoffwechselleistung des Darmes deutlich ab. Jejunumsegmente besaßen generell eine höhere Stoffwechselaktivität als Ileumsegmente. Bei einer mittleren Konzentration (6,48 nMol NDPA/ml) waren im Gewebe von Jejunumsegmenten etwa 20% der auf Metabolite entfallenden Radioaktivität kovalent gebunden.

4. Bei Perfusion mit NDBA wurde nicht nur im Jejunum, sondern auch im Ileum eine Akkumulation der Radioaktivität festgestellt. Sie war wie beim NDPA umgekehrt proportional zur Dosis, trat jedoch entschieden ausgeprägter auf. Beide Darmabschnitte bauten NDBA zu hydrophileren Metaboliten ab. Die begrenzte Stoffwechselkapazität zeigte sich in der starken Abnahme der Metabolisierungsraten mit steigender Konzentration. Sie war bei Ileumsegmenten erneut deutlich geringer als bei Jejunumsegmenten. Die Akkumulation der Radioaktivität im Resorbat war allein auf die gebildeten Metaboliten zurückzuführen, NDBA selbst wurde nicht im Resorbat angereichert. Nach Perfusion von Jejunumsegmenten mit 57,4 nMol NDBA/ml waren nur 6% der im Darmgewebe auf Metaboliten entfallenden Radioaktivität kovalent gebunden. Nach Vorbehandlung von Ratten mit Antibiotika war die Stoffwechselleistung von Jejunum und Ileum unvermindert. Eine bakterielle Beteiligung am intestinalen Stoffwechsel von NDBA konnte daher weitgehend ausgeschlossen werden.

5. Die Stoffwechselkapazität des Rattendarmes in vitro gegenüber symmetrischen Dialkylnitrosaminen nahm mit steigender Polarität ab. Das Nitrosamin mit der geringsten Polarität, NDBA, wurde am besten, jenes mit der höchsten Polarität, NDEA, praktisch nicht verstoffwechselt.

Summary

Transfer and metabolism of symmetric dialkylnitrosamines in jejunal and ileal segments of rats.

Transfer and metabolism of three symmetric dialkylnitrosamines were studied in perfused intestinal segments of rats.

Jejunal and ileal segments of 10cm length from female rats were prepared according to a modified method of Fisher and Parsons (10). Increasing amounts of 1-¹⁴C-Nitrosodiethylamin (NDEA), 1-¹⁴C-Nitrosodipropylamin (NDPA) and 1-¹⁴C-Nitrosodibutylamin (NDBA) were administered to the perfusion fluid (perfusate). After two hours the concentration of radioactivity was determined in the absorbed fluid (absorbate), perfusate and homogenate of intestinal tissue. Unchanged nitrosamines were separated from their metabolites by means of high-pressure liquid chromatography. Functional integrity of perfused segments was controlled by measuring glucose and sodium transfer.

The following results were obtained.

1. Nitrosamines in a concentration range of 10^{-11} and 10^{-7} Mol/ml perfusate did not influence significantly the transfer of glucose and sodium.
2. The absorption of NDEA was independent of the concentrations administered. Similar concentrations of radioactivity were found in absorbate, perfusate and homogenate of intestinal tissue (wet weight). No metabolites could be found in these fluids.
3. After perfusion of jejunal segments with NDPA an accumulation of radioactivity in the absorbate was observed, which was inversely correlated to the dose. Jejunal and to a lower extent ileal segments metabolized NDPA to more hydrophilic products. With increasing doses the percentage of metabolites formed decreased markedly. 20 percent of the metabolites present in jejunal tissue after perfusion with a medium dose (6.48 nMol NDPA/ml) were found to be covalently bound.

4. Jejunal as well as ileal segments accumulated radioactivity originating from NDBA in the absorbate. Again the accumulation was inversely correlated to the dose. Both intestinal segments metabolized NDBA to more hydrophilic compounds. The limited capacity to degrade NDBA was reflected in a decreased percentual metabolism with increasing dose. Ileal segments had a lower capacity as compared to jejunal segments. The accumulation of radioactivity in the absorbate was the result of the accumulation of metabolites. NDBA itself was not accumulated. After perfusion with 57.4 nMol NDBA/ml only 6% of the metabolites present in jejunal tissue were covalently bound. Pretreatment of rats with the antibiotics gentamicin and cefoxitin did not lower the metabolic capacity of jejunal and ileal segments towards NDBA. Therefore participation of bacteria in the metabolism process seems to be unlikely.

5. The metabolic capacity of in vitro rat intestinal preparations towards symmetric dialkyl nitrosamines decreased with increasing polarity of the nitrosamines. NDBA, the least polar nitrosamine investigated, was metabolized to the highest extent whereas the most polar NDEA was practically not metabolized at all.

Literaturverzeichnis

1. Hoensch, H.P. und F. Hartmann
The intestinal enzymatic biotransformation system: Potential role in protection from colon cancer
Hepato-Gastroenterol. 28(4): 221-228 (1981)
2. Wattenberg, L.W.
Dietary modification of intestinal and pulmonary arylhydrocarbon hydroxylase activity
Toxicology and Applied Pharmacology 23: 741-747 (1972)
3. Chhabra, R.S.
Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics
Environ. Hlth. Perspect. 33: 61-69 (1979)
4. Hoensch, H., C.H. Woo, S.B. Raffin und R. Schmid
Oxidative metabolism of foreign compounds in rat small intestine: cellular localization and dependence on dietary iron
Gastroenterology 70: 1063-1070 (1976)
5. Fang, W.F. und H.W. Strobel
Activation of carcinogens and mutagens by rat colon mucosa
Cancer Res. 38: 2939-2944 (1978)
6. Hoensch, H.
Fremdstoffabbauende Enzyme im Dünndarm und in der Leber von Mensch und Ratte: Einfluß von Nahrungsfaktoren und verschiedenen Krankheitsbildern
Habilitationsschrift-Venia legendi Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1979)
7. Hietanen, E. und O. Hänninen
Variable activities of drug-metabolizing enzymes in the gut of the rat after feeding with different pelleted diets
Comp. Gen. Pharmac. 5: 255-259 (1974)

8. Pinkus, L.M., J.N.Ketley und W.B.Jakoby
The glutathione S-transferases as a possible detoxification system
of rat intestinal epithelium
Biochem. Pharmacol. 26: 2359-2363 (1977)
9. Barr, W.H. und S. Riegelman
Intestinal drug absorption and metabolism I: Comparison of methods
and models to study physiological factors of in vitro and in vivo
intestinal absorption
J. Pharm. Sci. 59: 154-163 (1970)
10. Fisher, R.B. und D.S. Parsons
A preparation of surviving rat small intestine for the study of
absorption
J. Physiol. (London) 110: 26-46 (1949)
11. Komp, B. und W. Forth
Transfer across mucosal epithelium, tissue content and metabolic
fate of ¹²⁵I-(ipodate-sodium) on isolated everted segments of rat
small intestine
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311: 273-284 (1980)
12. Stohs, S.J., R.C.Grafström, M.D.Burke, P.W.Moldeus und S.G.Orrenius
The isolation of rat intestinal microsomes with stable cytochrome
P-450 and their metabolism of benzo(a)pyrene
Arch. Biochem. Biophys. 177: 105-116 (1976)
13. Druckrey, H.
Chemical carcinogenesis on N-nitroso derivatives
Gann 17: 107-132 (1975)
14. Preussmann, R.
Persönliche Mitteilung
15. Eisenbrand, G.
N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt: Eigenschaften,
Bildungswege, Nachweisverfahren und Vorkommen
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1981

16. Appel, K.E. und H. Graf
Metabolic nitrite formation from N-nitrosamines: evidence for a cytochrome P-450 dependent reaction
Carcinogenesis 3(3): 293-296 (1982)
17. Lorr, N.A. , Y.Y.Tu und C.S. Yang
The nature of nitrosamine denitrosation by rat liver microsomes
Carcinogenesis 3(9): 1039-1043 (1982)
18. Blattmann, L. und R. Preussmann
Struktur von Metaboliten carcinogener Dialkylnitrosamine im Rattenurin
Z. Krebsforsch. 79: 3-5 (1973)
19. Leung, K-H. und M.C. Archer
Urinary metabolites of N-nitrosodipropylamine, N-nitroso-2-hydroxypropylpropylamine and N-nitroso-2-oxo-propylpropylamine in the rat
Carcinogenesis 2(9): 859-862 (1981)
20. Okada, M. und M. Ishidate
Metabolic fate of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and its analogues. Selective induction of urinary bladder tumours in the rat
Xenobiotica 7: 11-24 (1977)
21. Druckrey, H., R. Preussmann, S. Ivankovic und D. Schmähl
Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten
Zeitschrift für Krebsforsch. 69: 103-201 (1967)
22. Singer, G.M., H.W. Taylor und W. Lijinsky
Liposolubility as an aspect of nitrosamine carcinogenicity: quantitative correlations and qualitative observations
Chem. Biol. Interact. 19: 133-142 (1977)
23. Lijinsky, W., M.D. Reuber und C.W. Riggs
Dose response studies of carcinogenesis in rats by nitrosodiethylamine
Cancer Res. 41: 4997-5003 (1981)

24. Lijinsky, W. und M.D. Reuber
Carcinogenesis in Fischer rats by nitrosodipropylamine,
nitrosodibutylamine and nitrosobis(2-oxopropyl)amine given by
gavage
Cancer Lett. 19: 207-213 (1983)

25. Rummel, W. und H.F. Stupp
Der Einfluß von Kalium und Calcium auf die Salz-, Glucose- und
Wasserresorption des isolierten Dünndarms
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 240: 79-92 (1960)

26. Markwell, M.A.K., S.M. Hass, L.L. Bieber und N.E. Tolberi
A modification of the Lowry procedure to simplify protein
determination in membrane and lipoprotein samples
Anal. Biochem. 87: 206-210 (1978)

27. Coulson, R.A. und J.D. Herbert
Reaction velocities in vivo: standardization of kinetic
"constants" by correction for blood flow
Comp. Biochem. Physiol. Pt. A. 72(1): 125-132 (1982)

28. Brittebo, E.B., B. Löfberg und H. Tjälve
Sites of metabolism of N-nitrosodiethylamine in mice
Chem. Biol. Interact. 34: 209-221 (1981)

29. Pegg, A.E. und W. Perry
Alkylation of nucleic acids and metabolism of small doses of
dimethylnitrosamine in the rat
Cancer Res. 41: 3128-3132 (1981)

30. Autrup, H., C.C. Harris und B.F. Trump
Metabolism of acyclic and cyclic N-nitrosamines by cultured human
colon
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 159: 111-115 (1978)

31. Montesano, R. und P.N. Magee
Comparative Metabolism in vitro of nitrosamines in various animal
species including man
IARC Scient. Publ. 10: 39-56 (1974)

32. Permezel, N.C. und D.D'A. Webling
The length and mucosal surface area of the small and large gut in young rats
J. Anat. 108: 295-296 (1971)

33. Suzuki, E. und M. Okada
Metabolic fate of N,N-dipropylnitrosamine and N,N-diamylnitrosamine in the rat, in relation to their lack of carcinogenic effect on the urinary bladder
Gann 72: 552-561 (1981)

34. Archer, M.C.
Reactive intermediates from nitrosamines
Adv. Exp. Med. 136(B): 1027-1035 (1982)

35. Brittebo, E.B. und H. Tjälve
Tissue-specificity of N-nitrosodibutylamine metabolism in Sprague-Dawley rats
Chem. Biol. Interact. 38: 231-242 (1982)

36. Janzowski, C., J. Gottfried, G. Eisenbrand und R. Preussmann
Fluoro-substituted N-nitrosamines. 3. Microsomal metabolism of N-nitrosodibutylamine and of fluorinated analogs
Carcinogenesis 3(7): 777-780 (1982)

37. Forth, W.
Persönliche Mitteilung

38. Schrenk, D., M. Schwarz, H.A. Tennekens und W. Kunz
A novel pathway of nitrosamine metabolism in liver microsomes: Denitrosation of nitrosamines by cytochrome P-450
Adv. Exp. Med. 136(B): 1157-1164 (1982)

39. Janzowski, C., B.L. Pool, R. Preussmann und G. Eisenbrand
Fluoro-substituted N-nitrosamines. 2. Metabolism of N-nitrosodiethylamine and of fluorinated analogs in liver microsomal fractions
Carcinogenesis 3: 155-159 (1982)

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr.W.Forth für die Überlassung des Themas danken.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr.K.Tempel für die Durchsicht der Arbeit und die wohlwollende Beratung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr.E.Richter für seine freundliche Unterstützung und seinen wertvollen Rat bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau B.Wankerl danke ich für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Bei Herrn Privatdozent Dr.M.Wiessler vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg bedanke ich mich für die Synthese von markierten Nitrosaminen.

LEBENS LAUF

Geboren: 26.6.1954 in Fürth/Bayern

Eltern: Hans-Dieter Richter, Diplom Brauerei Ingenieur
Irmgard Richter, geb. Scheuerer

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schul Ausbildung: Grundschule, Stepperg über Neuburg/Donau
September 1960 - Juli 1962
Grundschule, Lauterbach/Hessen
September 1962 - März 1964
Alexander von Humboldt Gymnasium, Lauterbach/Hessen
April 1964 - Juni 1972
Abschluß: Reifeprüfung

Ausbildung: Technische Universität München, Fakultät für
Landwirtschaft Weißenstephan
November 1972 - April 1974

Lehranstalt zur Ausbildung von vet. med. techn.
Assistenten an der Tierärztlichen Hochschule
Hannover
Oktober 1974 - September 1976
Examen: Staatl. anerkannte veterinärmedizinisch-
technische Assistentin

Berufstätigkeit: Vet. med. techn. Assistentin
am Institut für Medizinische Psychologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
April 1977 - September 1977

Studium: Ludwig-Maximilians-Universität München
Tierärztliche Fakultät
WS 1977/78 - Dezember 1982
Staatsexamen: Dezember 1982 in München

Approbation: 1983

